

B15

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. Juni 2005 (30.06.2005)

PCT

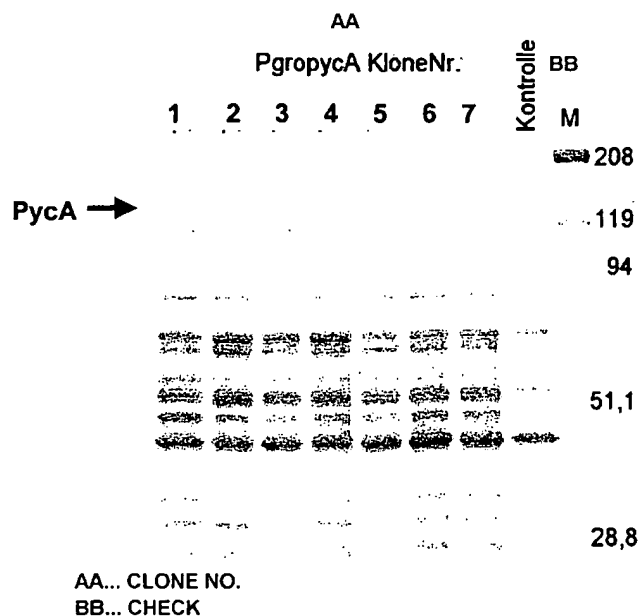
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/059143 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/77, (72) Erfinder; und  
C07K 14/34 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRÖGER, Burkhard  
[DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE).  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014263 ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Str. 8, 67346  
Speyer (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE];  
(22) Internationales Anmeldedatum: Rastatter Str. 10, 68239 Mannheim (DE). SCHRÖDER,  
15. Dezember 2004 (15.12.2004) Hartwig [DE/DE]; Benzstr. 4, 69226 Nussloch (DE).  
HAEFNER, Stefan [DE/DE]; Luitpoldstrasse 11, 67063  
(25) Einreichungssprache: Deutsch Ludwigshafen (DE).  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF Aktiengesellschaft;  
67056 Ludwigshafen (DE).  
(30) Angaben zur Priorität: 103 59 595.3 18. Dezember 2003 (18.12.2003) DE (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PGRO EXPRESSION UNITS

(54) Bezeichnung: PGRO-EXPRESSIONSEINHEITEN



(57) Abstract: The invention relates to the use of nucleic acid sequences for regulating gene transcription and expression, said novel promoters and expression units, methods for modifying or inducing the gene transcription rate and/or expression rate, expression cassettes containing said expression units, genetically modified microorganisms having a modified or induced transcription rate and/or expression rate, and methods for producing biosynthetic products by cultivating said genetically modified microorganisms.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/059143 A1



MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

## Pgro-Expressionseinheiten

### Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthal-
- 10 tend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

- Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter
- 15 anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemikalien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl
- 20 proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für die-
- 25 sen Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

- Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der
- 30 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie aber auch Sprühtrocknung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften
- 35 des Mikroorganismus selbst betreffen.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf
- 40 die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

- Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.
- 10 Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch -35 und -10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomale Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.
- 15 Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodons der Translation befinden.
- 20 In der Literatur (E. coli und S. typhimurium, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukleotidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukleotidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationsrate der Translation hat.
- 25 Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.
- 35
- Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der
- 40

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

5

In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.

20 Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierendes Strukturgen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneform-  
25 reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reportergen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche  
30 transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reportergenes bei Wachstum auf Acetat haltigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reportergens.

35

In Pa'tek et al., Microbiology 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reportergens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

40

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression genutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide beschrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschriebene Methode, Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter anderem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

10

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressionseinheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend

20

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
- oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

25

zur Transkription von Genen verwenden kann.

30

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den ausgehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

35

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Produkt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfindungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in einem Mikroorganismus beeinflussen.

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

- 5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator
- 10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als
- 15 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 20

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

- 25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff „Wildtyp“ wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

- 30 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Mikroorganismus“ der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

- 35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter „Wildtyp“ für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Transkriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung *Corynebacterien* und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in  
10 der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonders bevorzugt *Corynebakterien* bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen,  
15 wie beispielsweise die Mutation T311I.

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer  
20 RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war..

Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

25

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promotors, beispielsweise durch Mutation des Promotors oder durch Stimulierung oder Hemmung des Promotors erfolgen.

Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-  
40



ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man

5 eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

- 20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder  
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist  
oder  
25 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder  
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

30 Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz des GroES Chaperonin (Pgro) aus *Corynebacterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps..

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete  
35 Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-  
40

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

- Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch
- 5 Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

- Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen
- 10 von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

- Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch
- 15 Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- 20 Multiple alignment parameter:  
Gap opening penalty 10  
Gap extension penalty 10  
Gap separation penalty range 8  
Gap separation penalty off
- 25 % identity for alignment delay 40  
Residue specific gaps off  
Hydrophilic residue gap off  
Transition weighing 0
- 30 Pairwise alignment parameter:  
FAST algorithm on  
K-tuplesize 1  
Gap penalty 3  
Window size 5
- 35 Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

- 5 Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

- 10 Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

- 20 Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

- 25 Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte  
30 Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

- Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

- 35 Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist.

- 40

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz

5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend

15

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
- 20 oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie

30 beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-

35 Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine

40 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

5 Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

10 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne  
15 erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide  
20 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

25 Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit ver-  
30 standen.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

35 Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

- 5 Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

- 10 Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 15 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

- 20 eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 25 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 30 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 10 F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- 15 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit des GroES Chaperonin (Pgro) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

- 30 Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

- 35 Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität
- 40 von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens

15

10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

20

25

Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

30

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

35

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

40



bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-  
ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B.  
etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-  
dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges  
5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte  
stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen  
Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz  
10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten  
oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten,  
Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische  
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden  
die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-  
zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-  
gangssequenz aufweist.  
20

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G)  
beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugsweise weisen diese Frag-  
mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevor-  
25 zugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ.  
ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als  
Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.  
30

Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-  
schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen  
Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-  
dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine  
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend  
40

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- 5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgenden genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10") Sequenz; eine Minus 35 (" -35") Sequenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.

Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies Corynebakterien, speziell für *Corynebacterium glutamicum*.

Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardliteraturstellen beschrieben: Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986); J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer and P. Berg, *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California

- (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989).

- 10 Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch  
15 synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

- 20 Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

- Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden. Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate  
30 von gewünschten Genen erreicht werden kann.

- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.  
35

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in *Corynebacterium species* dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 10 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 15 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -10-Region und -35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als - Operatoren bekannt) für Regulationsproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzym gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzym abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenz SEQ. ID. NO. 40 52 die -10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar. Veränderungen

der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

- Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

- Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

- Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. als ribosomale Bindungsstelle verwendet.

- Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region verwendet.

- In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

- Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

- Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

- b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, er-

folgt oder

5 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

15 gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

35 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

- 5 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 10 Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

- 15 Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

- 20 In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

- 25 Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

- Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

- 30 Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls  
35 weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

tere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter einem „kodierenden Bereich“ wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die ein Protein kodiert.

5

Unter „heterolog“ in Bezug auf Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität transkribiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Nukleinsäure mit Promotoraktivität und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

10

Unter „heterolog“ in Bezug auf Expressionseinheiten und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten exprimiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Expressionseinheit und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

15

Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

20

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

25

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

30

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) dadurch erreicht wird, dass man

35

bh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer en-

40



dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5       bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10       bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15       Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

20       ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

25       br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

30       c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

35       d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Expressionssrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

40

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

- 5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

- 10 In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

- 20 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 25 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 30 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

- 35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 40 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 15 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.
- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.
- 25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von
- 30 proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren
- 35 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gege-

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5 Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methyl-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
- 20 Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus *Corynebacterium glutamicum*.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs- dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	---------------------------	---------------------	--------------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.:6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrognease	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot.: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot.: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot.: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	metH	EP 1108790	DNA: 1663 Prot.: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot.: 4226
Methylentetrahydro-folat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot.: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot.: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot.: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756



Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxodoreduktase	mgo	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6- biphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6- phosphogluconolacto- nase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 genannt, (SEQ. ID. NO. 51) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 50).

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform, weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expression der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfindungsgemäßen Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche Verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequenzen. Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die Codon-Usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebacterium glutamicum* die Codon-Usage von *Corynebacterium glutamicum* zu verwenden. Die Codon-Usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25 In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30 In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code – an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35 In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code – an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

40

- Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils
- 5 obenstehende, nächstliegende Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminosäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.
- 10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:
- A Alanin
  - C Cystein
  - D Aspartat
  - 15 E Glutamat
  - F Phenylalanin
  - G Glycin
  - H His
  - I Isoleucin
  - 20 K Lysin
  - L Leucin
  - M Methionin
  - N Asparagin
  - P Prolin
  - 25 Q Glutamin
  - R Arginin
  - S Serin
  - T Threonin
  - V Valin
  - 30 W Tryptophan
  - Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkinase
	311	T	I	
	279	A	T	

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Efflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Deydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung o-  
der Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mik-  
roorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von  
5 genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch  
veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur  
Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsge-  
mäßigen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionsein-  
heiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nuk-  
10 leinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in  
coryneforme Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch  
A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose clo-  
15 ning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of  
defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul  
22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange  
in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive  
pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsge-  
mäßigen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate  
und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfin-  
dungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expres-  
sionseinheiten in den Mikroorganismus.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfin-  
dungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkripti-  
onsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen  
30 der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in  
den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend  
35 mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimie-  
rendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

- 5 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10

- Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend  
15 ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren  
20 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

- Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und  
25 deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

- In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die  
30 "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung, Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer  
35 Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

40



Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die  
5 Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität  
10 heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man  
15

b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder  
20

b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder  
25

b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.  
30

Die Erfindung betrifft ferner eine genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei  
35

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge  
40

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

- bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

- Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

- ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

- br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

5 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

10

d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

15

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20

d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

40

- ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,
- 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder
- dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass
- 40 die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expres-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu eprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskassette.

Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung gentisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkrip-

- tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II
- 10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase
- 15

- Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.
- 20

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakterien, Algen, Pilze oder Hefen.

- 25 Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind insbesondere coryneforme Bakterien.

- Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacterium*, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium divaricatum*.
- 30

- Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divarica-*
- 40

tum ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

- 5 Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium		Hinterlegungsnummer							
Genus	species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							



Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujikense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							

Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							

Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20

Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

25

Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

30

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

40

men.

- Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu Erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.
- 10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.
- 15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.
- 20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.
- 25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.
- Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propan-3,1-diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

- Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und  
5 sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10 *I. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen*

- Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt,  
15 dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren  
20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauewege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin,  
25 Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu syn-  
30 thetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

- Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen An-  
35 wendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie  
40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- $\beta$ -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pentsesphosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

- Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-
- 5 Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-
- 10 Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

## II. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

- Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen.
- 15 Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischen-
- 20 produkte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt
- 25 und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder
- 30 anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

- 35 Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and
- 40



Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B6" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, 10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxin-hydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Pantothothenat-Biosynthese bestehen aus 15 der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Pantothothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Pantothothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von 20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Pantothothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B<sub>5</sub>), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des 30 α-Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoessäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-Aminobenzoessäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden. 35

- Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B<sub>12</sub>) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> ist hinreichend komplex, daß sie noch 40 nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

ligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B<sub>6</sub>, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B<sub>12</sub> wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

10

### III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15 Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, 20 einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die 25 RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen. 30

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressivum oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin- 40

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden  
5 gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den  
10 Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides";  
15 Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich  
20 die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.  
30

#### *IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen*

35 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über  $\alpha,\alpha$ -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610;  
40 Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. *Biotech Ann. Rev.* 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. *J. Japan* 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, S. 561-612, in *Biotechnology* Bd. 6,

15

Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diole wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" *Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien*, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), *Enzyme Polyketide* (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

30

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-Ileucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- 5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im  
10 Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,  
und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine  
15 Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-  
20 Oxoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend  
30 eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.
- Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression  
35 dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man  
dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit  
40 erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
- 20 Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydropicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität
- 25 des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität,
- 30 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

- Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-
- 35

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

30

35

40



Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und  
 5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzier-  
 10 te Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

15 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

25 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im  
 30 Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine  
 35 Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin  
 40 Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren

5 kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op-  
cA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-  
10 Dehydrogenase

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man  
15

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder  
20

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder  
25

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.  
30

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-  
40

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität dieses Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.

Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständige Fehlen der entsprechenden Aktivität.

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.

Beispielsweise wird unter einer Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.

Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

10 Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständige Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase - Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

- 5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

- 10 Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- 15 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

- 20 Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- 35 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-40 10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195

(1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Verstärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachromosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder
- 15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorganismus.

Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer Expressionskassette, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch

20 die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine kodiert verwendet werden.

- 25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 35
- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährende Expressionskassette

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 5      • Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 10      • Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen das Zielgen generiert werden.
- 15      • Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

20      Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25      Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des  
30      RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

35      Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

40      Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-



- verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

- Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

- Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

- Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

- Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

- 10 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

- 15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue  
20 Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.  
25

- Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.  
30

- Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht läßt sich während der Anzucht durch Zugabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,  
40

- wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die
- 5 Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- 10 Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.
- Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren
- 15 wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.
- Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.
- 20 Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.
- 25 Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.
- 30 Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produktthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chroma-
- 40 tographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

- Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des
- 10 Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al.
- 15 (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biol-
- 20 ogy, Bd. 17.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25 Beispiel 1

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des pycA-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Pgro (SEQ ID 2)

- Zur Amplifizierung des Promoters des Gens, das für das Chaperenin Gro ES kodiert,
- 30 wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ. ID. NO 5:

gro3: 5'-gccgcagcaaaccagtag -3'

- 35 SEQ. ID. NO. 6:

gro11: 5'- agtcgacacgatgaatccctccatgagaaaa-3'

- Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 427 bp entsprach.
- 40

Zur Amplifizierung eines Teils des Gens, das für das Pyruvat-Carboxylase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

5 SEQ. ID. NO. 7:

pyc6: 5'- ttttctcatggagggttcacgtgtcgactcacacatcttcaacgcttccag-3'

SEQ. ID. NO. 8:

pyc3: 5'- cccgcagcaacgcacgcaagaaa-3'

10

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1344 bp entsprach.

15 Die Primer gro11 und pyc6 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

20 SEQ. ID. NO. 9:

gro12: 5'- gcattcgcgccgctcgtaacta-3'

SEQ. ID. NO. 10:

pyc11: 5'- gggtcccgcgccctggtaa-3'

25

Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1107 bp entsprach. Diese Pgro/pycA-Fusion wurde dann in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Pgro/pycA aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als 1125 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 11 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Pgro pycA bezeichnet.

30 Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des pycA-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

35

SEQ. ID. NO. 12:

pyc14: 5'- ccggcgaagtgtctgctcgctga-3'

40 SEQ. ID. NO. 13:

pyc15: 5'-accccgccccagttttc-3'

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 487 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 593 bp SpeI/XbaI-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob sacB Psodask kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob sacB Pgro pycA + US (SEQ. ID. NO. 14) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB Pgro pycA + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AclIM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AclIM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob sacB Pgro pycA + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten (10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefeextrakt, 22,0 g/l Agar (Difco)) mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten.

Zur Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis, das zur Excision des Vectors samt dem pycA-Promoter und dem pycA-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob sacB vorhandenen sacB-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Synthese von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum* Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 15 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die Pgro-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomale DNA aus dem Ausgangsstamm und den 15 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H<sub>2</sub>O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Jeweils 10 µl

der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Pgro-Expressionseinheit und dem pycA-Gen homolog sind.

- 5 Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; Hybridisierung 30 sec bei 56°C; Amplifizierung 1 min bei 72°C; 30 Zyklen; End-Extension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch der natürlichen Expressionseinheit (PpycA) gegen Pgro vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe von 310 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 15 Klonen 7 Klone positiv.

- Die 7 positiven Klone und der Ausgangsstamm wurden anschließend in 10 ml CM-Medium (10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 15 10 g/l Hefeextrakt) über Nacht angezogen. Anschließend wurde die Zellen pelletiert und in 0,5 ml Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl; pH 7,7) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ribolyzers (3 x 30 sec bei Stufe 6, Fa. Hybaid). Nach einer Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode wurden jeweils 15 µg Protein auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt. Im Vergleich zum Ausgangsstamm konnte eine erhöhte Menge an PycA-Protein detektiert werden (Figur 1). Figur 1 zeigt ein 10%iges SDS-Gel der Pgro pycA-Klone.

#### Beispiel 2

- 25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 16 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO: 15

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACAG-3'

- 35 SEQ ID NO: 16

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTCG-3'

- Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer  
40 SEQ ID NO: 15 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen

Smal, BamHI, NheI und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:16 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:17 und SEQ ID NO:18 eine Kanamycin-Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:17

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:18:

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:17 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, Smal, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:18 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und NheI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.



- 5 fication Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in
- 10 Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- 15 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.
- 20 Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955,
- 25 Virology, 1:190) erreicht.
- 30 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.
- 35 Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:19 und SEQ ID NO: 20 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.
- 40 SEQ ID NO: 19

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO: 20:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

5

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 19 und SEQ ID NO: 20 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem

10

15

20

25

GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beiden synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 22, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, Sall, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

40

SEQ ID NO: 21:

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCGGTACCACGCGTCATAT  
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC  
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTTAAAT-3'

5

SEQ ID NO22:

5'-GATCATTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG  
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAC TAGTCATATGACGCGTGGTACCG  
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTTAAAT-3'

10

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO: 23 aufgeführt.

35

### Beispiel 3

#### Herstellung des Plasmids PmetA metA

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-

40

riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 24 und SEQ ID NO 25, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusive des nichkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

SEQ ID NO 24

5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCAGTGCT -3'

und

10 SEQ ID NO 25

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30 Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pClik5MCS PmetA metA ist als SEQ ID NO 26: aufgeführt.

40 Beispiel 9

## Herstellung des Plasmid pCLiK5MCS Pgro metA

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-  
5 riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 27 und SEQ ID NO 28, der chromoso-  
malen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe  
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990)  
PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Frag-  
ment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Ex-  
pressionseinheit) der Gens GroES (Pgro) amplifiziert.  
10

SEQ ID NO: 27

5'-GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC -3'

und

15 SEQ ID NO :28

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGATGAATCCCTCCATGAG -3'

Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purifica-  
tion Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.  
20

Ausgehend vom Plasmid PmetA metA als Template für eine PCR Reaktion wurde mit  
den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO: 30 ein Teil von metA ampli-  
fiziert.

25 SEQ ID NO 29

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

und

SEQ ID NO 30

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

30

Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem  
GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gerei-  
nigt.

35 In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente ge-  
meinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID  
NO: 28 eingebrachten, zu metA homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-  
Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung  
zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Stan-  
dardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidpri-  
40

mer SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 30 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.

- Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem
- 5 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt.
- 10 Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO: 26 wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt.
- 15 Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- 20 Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert.
- 25 Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

- Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977)
- 30 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

- Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PGroESmetA ist als SEQ ID NO: 31 aufgeführt.
- 35

Beispiel 10

MetA-Aktivitäten

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA und pCLiK5MCS PGroESmetA nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

*C. glutamicum* Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,25g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 54 g Aces, 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l  $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 10 g/l  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g/l  $\text{CuSO}_4$ , 0,02 g/l  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 100 µg/l Vitamin B<sub>12</sub>, 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin ( 100 mg/l), pH7,0) bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem Tris-HCl-Puffer ( 0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD<sub>600</sub> von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorffzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorffcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufgenommen.

30

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

Stamm	spezifische Aktivität [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS PGroESmetA	109,0

35

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit erheblich gesteigert werden.

#### Beispiel 11

#### 5 Herstellung des Plasmids pClik5MCS metA ohne Startcodon

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 32 bis SEQ ID NO 33, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe  
10 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, die terminationsregion des groEL Gens amplifiziert.

#### 15 SEQ ID NO 32

5'- GGATCTAGAGTTCTGTGAAAAACACCGTG-3'

#### SEQ ID NO 33

5'- GCGACTAGTGCCCCACAAATAAAAAACAC-3'

20

Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 60 bp Größe wurden mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen  
25 XbaI und BclI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit dem Restriktionsenzymen XbaI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit  
30 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem 60 bp großen Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.



Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PgroES term SEQ ID NO: 34 aufgeführt.

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, das *metA* Gen ohne Startcodon amplifiziert.

SEQ ID NO 35

5'-GAGACATATGCCCACCCTCGCGCCTTCAGG -3'

und

SEQ ID NO 36

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,2 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen NdeI und BclI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pCLiK5MCS groEL term SEQ ID NO: 34 wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und BclI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS metA ohne Startcodon ist als SEQ ID NO: 37 aufgeführt.

10

#### Beispiel 12

Konstruktion von Expressionseinheiten Pgro mit unterschiedlichen spezifischen Expressionsaktivitäten durch unterschiedliche RBS-Sequenzen und Abstände zum Startcodon von metA

15

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 38 bis SEQ ID NO 43, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, die verschiedenen Expressionseinheiten amplifiziert. Dabei diente der Oligonukleotidprimer 1701 (SEQ ID NO 38) als sense Primer und wurde mit den anderen Oligonukleotidprimern kombiniert.

25

SEQ ID NO 38

Oligonukleotidprimer 1701

5'- GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC-3'

30

SEQ ID NO 39

Oligonukleotidprimer 1828

5'- ctctcatatgcAATCCCTCCATGAGAAAAATT-3'

SEQ ID NO 40

35

Oligonukleotidprimer 1831

5'- ctctcatatgcgcggccgcAATCCCTCCATGAGAAAAATT-3'

SEQ ID NO 41

Oligonukleotidprimer 1832

40

5'- ctctcatatgcAActctccATGAGAAAAATTTTGTGTG-3'

SEQ ID NO 42

Oligonukleotidprimer 1833

5'- ctctcatatgcAAtctcctcATGAGAAAAATTTTGTGTG-3'

5

SEQ ID NO 43

Oligonukleotidprimer 1834

5'- ctctcatatgcAAtcccttcATGAGAAAAATTTTGTGTG-3'

- 10 Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 200 bp Größe wurden mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- 15 Der Vektor pBS KS+ (SEQ ID NO: 44) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und ein 2,9 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

- 20 Das Vektorfragment wurde zusammen mit den PCR-Fragmenten mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

25

- Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.
- 30

Das entstandenen Plasmid wurden mit pKS Pgro 1701/1828, pKS Pgro 1701/1831, pKS Pgro 1701/1832, pKS Pgro 1701/1833 und pKS Pgro 1701/1834 bezeichnet.

- 35 Diese Plasmide wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 200 bp Größe wurden isoliert und mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- Der Vektor pCLiK5MCS metA ohne Sartcodon SEQ ID NO: 37 wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- 5 Das Vektorfragment wurde zusammen mit den 200 bp großen Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- 10 Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.
- 20 Das entstandenen Plasmide pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA , pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA und pCLiK5MCS Pgro 1701/1834 metA sind als SEQ ID NO: 45 bis 49 aufgeführt.
- 25 Der Expressionseinheit Pgro wurde durch die Wahl der Oligonukleotide wie in Figur 2 beschrieben verändert.
- Der Stamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS Pgro metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA, ,
- 30 pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA , pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA und pCLiK5MCS Pgro 1701/1834 nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene
- 35 Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.
- C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium (40 g/l Saccharose, 20 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,25g/l MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 54 g Aces, 1 ml CaCl<sub>2</sub> (10 g/l), 1 ml Protocatechuat (300 mg/10
- 40 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l FeSO<sub>4</sub> x /H<sub>2</sub>O, 10 g/l MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 2 g/l

- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l CuSO<sub>4</sub>, 0,02 g/l NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O), 100 µg/l Vitamin B<sub>12</sub>, 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin ( 100 mg/l), pH7,0) bei 30°C für 5 h angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die
- 5 Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer ( 0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD<sub>600</sub> von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserörchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfsentrifuge geklärt
- 10 und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

- Die enzymatische Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100
- 15 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufgenommen.

- 20 Die Ergebnisse sind in Tabelle 2a gezeigt.

Tabelle 2a

Stamm	spezifische Aktivität [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	7,5
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro metA	109,0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA	30,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA	8,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA	60,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA	217,3
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1835 metA	96,3

## Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
- 5           A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder  
          B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
- 10          C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder  
          D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)
- zur Transkription von Genen.
- 15
2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.
- 20
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit enthält:
- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 25          F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder  
          G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- 30          H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 besteht.
- 35
5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder  
          B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %

auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist  
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

5 D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1  
ausgenommen ist.

10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

15 7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend

E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder

F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder

20 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2  
ausgenommen ist.

8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

30 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp  
oder

35 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 10 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 15 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 30 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 35 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit



Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

- 5           bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 10
- bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 15
- bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 20
12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 25
- ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 30
- br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- 35
13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 5 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 10 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 20 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- 25 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 30 d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 35 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 40 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20
- dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25
- dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30
17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur
- 35 Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylentetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-

Synthase, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

10

20. Expressionskassette, umfassend

- a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und
- b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

15

wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

20

21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen

25

30

35

22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serin-hydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase
23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22.
24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

- 5           b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 10       25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15           b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20           b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 25           b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30       26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass
- 35           ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder
- 40           der

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

5

27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

10

bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15

20

bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25

bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30

28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35

ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40



- 5  
br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- 10  
29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- 15  
c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 20  
d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 25  
30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 30  
d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 35  
d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

15

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-  
einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifi-  
scher Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere,  
zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit redu-  
zierter Expressionsrate von mindetstens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp,  
dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens  
einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die  
Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich  
zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit re-  
duzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus einge-  
bracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der  
Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3  
mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit  
gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen,  
wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine  
Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nuk-  
leinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von proteinogenen  
und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein  
aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren  
kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nuk-  
leinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und  
Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg  
von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von  
Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosynthese-  
weg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus  
dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus  
dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- 5 37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydropicolinate-Synthetase, Dihydropicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, 10 Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, 25 Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 30 38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.
- 35 39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-
- 40

- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase,
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OPCA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

- Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.
- 5
42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-

- moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystahionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystahionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.
44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, , Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend

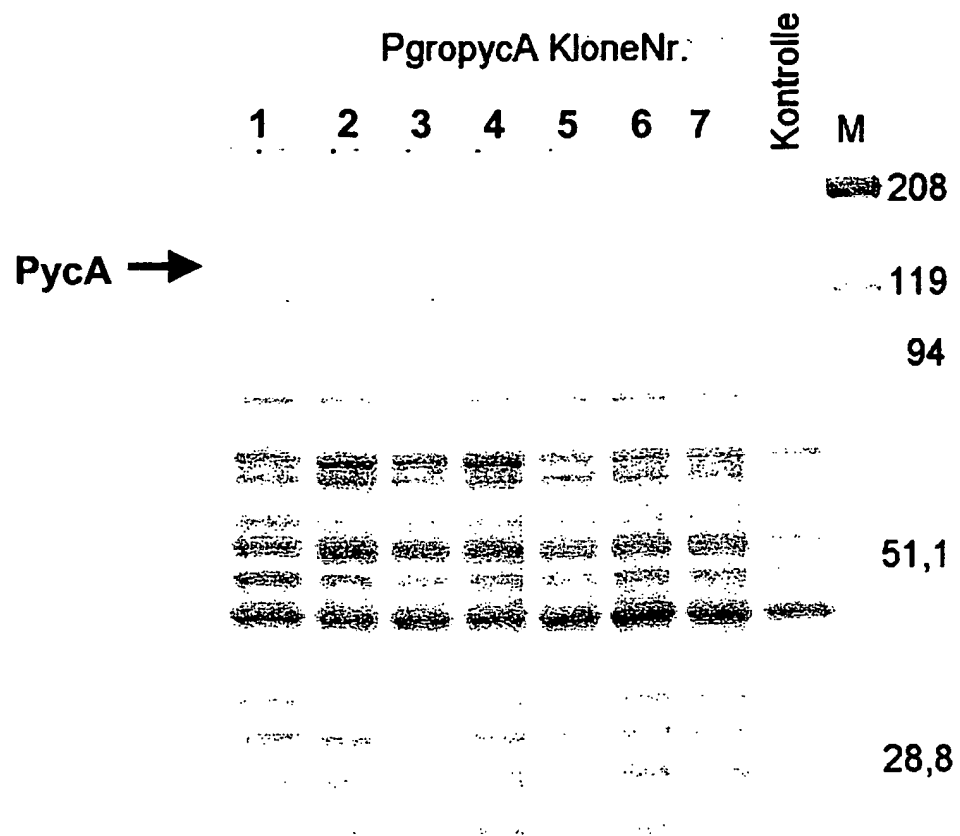
- 5       einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase
- 10       46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, 15       Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase' und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.
- 20       47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, 25       Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität , Ketol-Aid-Reductoisomerase- Aktivität, Branched chain aminotransferase- Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase- Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase- Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
- 30       48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-
- 35
- 40



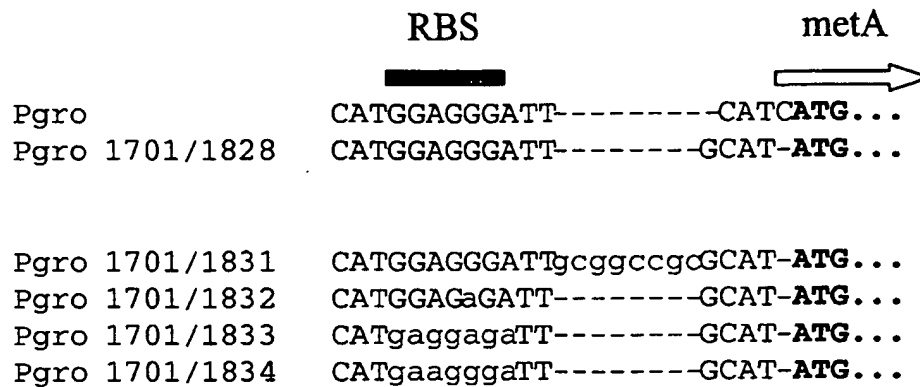
schrittes aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgereinigt werden.

- 5           49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 10          50. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 15          51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53.
- 20          52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. als ribosomale Bindungsstelle verwendet wird.
- 25          53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52.
54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region verwendet wird.

Figur 1



Figur 2



## SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft  
 5 <120> Pgro-Expressionseinheiten  
 <130> PF 55184/Mec  
 <160> 53  
 10 <210> 1  
 <211> 164  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 15 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_1\_GROES\_RXA00497\_PROMOTOR  
 <400> 1  
 20 cggcttaaag ttgggtgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60  
 tctcgggggt agagtgccaa ataggttggt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120  
 ctgtgctgga aaccacaac cggcacacac aaaatttttc tcat 164  
 25 <210> 2  
 <211> 177  
 <212> DNA  
 30 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_2\_GROES\_RXA00497\_GESAMTE\_EXPRESSIONSEINHEIT  
 35 <400> 2  
 cggcttaaag ttgggtgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60  
 tctcgggggt agagtgccaa ataggttggt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120  
 40 ctgtgctgga aaccacaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg attcatc 177  
 <210> 3  
 <211> 1365  
 45 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_3\_RXA00077  
 50 <400> 3  
 atgaatgatg agaattattca aagctccaac tatcagccat tcccgagttt tgacgattgg 60  
 aaacagatcg aggtgtcgct cttagatgtc atcgaatcct cagccattt ttctgatttg 120  
 55 aaagatagca ctgatcggtc tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180  
 gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcggttt taccataca 240  
 60 gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300  
 cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcatgacagt aactggtaga 360  
 actccaatct ctacagcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420  
 65 agccacgagg tttttacagc cgttgagtc caaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480  
 aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cggcccagtt 540

gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600  
 5 gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660  
 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720  
 cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780  
 10 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840  
 actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaate tggttcggct 900  
 15 aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960  
 aggtccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020  
 aatgggttg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt cccattcaa tctgccagag 1080  
 20 ggctataacg ctttcctga tagctattgt ctgacctag ctttcaatag caactctcca 1140  
 aaacaaatct tccaccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200  
 agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260  
 25 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320  
 gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

30

<210> 4  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

35

<400> 4  
 Met Asn Asp Glu Asn Ile Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Pro Phe Pro Ser  
 1 5 10 15  
 40 Phe Asp Asp Trp Lys Gln Ile Glu Val Ser Leu Leu Asp Val Ile Glu  
 20 25 30  
 45 Ser Ser Arg His Phe Ser Asp Leu Lys Asp Ser Thr Asp Arg Ser Ala  
 35 40 45  
 Leu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Ala Lys Arg Ala Ala Ala Val Asp Thr  
 50 55 60  
 50 Asn Ala Ile Glu Gly Ile Phe Gln Thr Asp Arg Gly Phe Thr His Thr  
 65 70 75 80  
 Val Ala Thr Gln Val Gly Ala Trp Glu Gln Gln Met Ala Met Lys Gly  
 85 90 95  
 55 Lys His Val Lys Pro Ala Phe Asp Asp Thr Leu Glu Gly Phe Glu Tyr  
 100 105 110  
 Val Leu Asp Ala Val Thr Gly Arg Thr Pro Ile Ser Gln Gln Trp Ile  
 60 115 120 125  
 Arg Asn Leu His Ala Val Ile Leu Arg Ser Gln Glu Ser His Glu Val  
 130 135 140  
 65 Phe Thr Ala Val Gly Val Gln Asn Gln Ala Leu Gln Lys Gly Glu Tyr  
 145 150 155 160  
 Lys Thr Gln Pro Asn Ser Pro Gln Arg Ser Asp Gly Ser Val His Ala

3

165 170 175  
 Tyr Ala Pro Val Glu Asp Thr Pro Ala Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser  
 180 185 190  
 5 Glu Leu Glu Ser Lys Glu Phe Leu Ala Ala Glu Lys Val Ile Gln Ala  
 195 200 205  
 Ala Tyr Ala His Tyr Ala Phe Val Cys Ile His Pro Phe Ala Asp Gly  
 210 215 220  
 10 Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp  
 225 230 235 240  
 15 Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile  
 245 250 255  
 His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg  
 260 265 270  
 20 Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp  
 275 280 285  
 Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp  
 290 295 300  
 25 Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His  
 305 310 315 320  
 30 Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu  
 325 330 335  
 Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile  
 340 345 350  
 35 Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser  
 355 360 365  
 Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe  
 370 375 380  
 40 His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser  
 385 390 395 400  
 45 Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr  
 405 410 415  
 Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val  
 420 425 430  
 50 Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala  
 435 440 445  
 Lys Lys Phe Gln Gln Asn  
 450  
 60 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_5\_GRO3  
 65 <400> 5  
 gccgcagcaa acccagtag

<210> 6  
<211> 31  
<212> DNA  
5 <213> Corynebacterium glutamicum  
  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_6\_GRO11  
  
10 <400> 6  
agtcgacacg atgaatccct ccatgagaaa a 31  
  
<210> 7  
15 <211> 54  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum  
  
<220>  
20 <223> SEQ\_ID\_7\_PYC6  
  
<400> 7  
tttttctcat ggagggattc atcgtgtcga ctacacatc ttcaacgctt ccag 54  
  
25  
<210> 8  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum  
  
30  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_8\_PYC3  
  
<400> 8  
35 cccgcagcaa cgcacgcaag aaa 23  
  
<210> 9  
<211> 22  
40 <212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum  
  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_9\_GRO12  
  
45 <400> 9  
gcattcgcgc cgctcgtaac ta 22  
  
50  
<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum  
  
55  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_10\_PYC11  
  
<400> 10  
60 ggttcccgcg ccctggtaa 19  
  
<210> 11  
<211> 5720  
<212> DNA  
65 <213> Corynebacterium glutamicum  
  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_11\_PK19\_MOB\_SACB

```

    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (562) .. (1356)
5    <223> KanR

    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1385) .. (1847)
10   <223> PsacB

    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1848) .. (3266)
15   <223> SacB

    <400> 11
    ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gtcggaattc actggccgctc gttttacaac 60
20   gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg ccttgacgca catccccctt 120
    tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 180
    gcctgaatgg cgaatggcga taagctagct tcacgctgcc gcaagcactc agggcgcaag 240
25   ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacgggtg ctgacccccg 300
    atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag 360
30   gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctgactggg cggttttatg gacagcaagc 420
    gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac 480
    tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag 540
35   acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 600
    gcttgggttg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat 660
40   gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg 720
    tccggtgccc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg 780
    ggcgttcctt gcgcagctgt gtcgacggt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840
45   ttgggcgaag tgccggggca ggatctctg tcattctacc ttgctcctgc cgagaaagta 900
    tccatcatgg ctgatcaat gcggcggtg catagcttg atccggctac ctgccattc 960
50   gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc 1020
    gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg 1080
    ctcaaggcgc ggatgcccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga tgcttgcttg 1140
55   ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt 1200
    gtggcggaac gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc 1260
60   ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctccga ttcgcagcgc 1320
    atgccttct atgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttgctagag 1380
    gatcgatcct ttttaacca tcacatatac ctgccgttca ctattattta gtgaaatgag 1440
65   atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgcccac gcaacagaaa 1500
    ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt ttagttctt taggcccgtg 1560

```



gtctgcaaat ccttttatga ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620  
5 ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga aaagtaaate gcgcgggttt gttactgata 1680  
aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt caccctttac 1740  
atatttttagg tcttttttta ttgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac aggagggtcg 1800  
10 gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860  
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa 1920  
15 ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaaccaa agccatataa ggaaacatac ggcatttccc 1980  
atattacacg ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040  
tttctgaatt tgattcgtcc acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt 2100  
20 gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcaactgctc aaactatcac ggctaccaca 2160  
tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220  
25 atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtctttaaaag 2280  
acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag 2340  
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat ttctccggtg 2400  
30 aacattacgg caaacaacaa ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460  
ctttgaacat caacggtgta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520  
35 atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag gcaactacag ctgaggcgac aaccatacgc 2580  
tgagagatcc tctactagta gaagataaag gccacaaata cttagtattt gaagcaaaac 2640  
ctggaactga agatggctac caaggcgaa aatctttatt taacaaagca tactatggca 2700  
40 aaagcacatc attcttccgt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaacgcga 2760  
cggctgagtt agcaaacggc gctctcggta tgattgagct aaacgatgat tacacactga 2820  
45 aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga 2880  
acgtctttaa aatgaacggc aaatggtacc tgttcactga ctcccgcgga tcaaaaatga 2940  
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa 3000  
50 ctggcccata caagccgctg aacaaaactg gccttgtgtt aaaaatggat cttgatccta 3060  
acgatgtaac ctttacttac tcacacttcg ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg 3120  
55 tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180  
cgagcttcct gctgaacatc aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg 3240  
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaatgccga tgggtaccga 3300  
60 gcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaccc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 3360  
ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccctcgcg gacgtgtcga 3420  
65 tagtccacga cgcccgatg tttgtagccc tggccgacgg ccagcaggta ggccgacagg 3480  
ctcatgccgg ccgcccgcgc cttttcttca atcgctcttc gttcgtctgg aaggcagtac 3540  
accttgatag gtgggctgcc cttctggtt ggcttggtt catcagccat ccgcttgccc 3600

tcattctgtta cgccggcggg agccggccag cctcgagag caggattccc gttgagcacc 3660  
gccagggtgcg aataagggac agtgaagaag gaacacccgc tcgcggttg gcctacttca 3720  
5 cctatcctgc ccggctgacg ccgttgata caccaaggaa agtctacacg aacccttttg 3780  
caaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg aaaaaatcgc tataatgacc 3840  
10 ccgaagcagg gttatgcagc ggaaaagcgc tgcttcctcg ctgttttggtg gaatatctac 3900  
cgactggaaa caggcaaatg caggaaatta ctgaactgag gggacaggcg agagacgatg 3960  
ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatcgc cccggtagtg atcttatttc 4020  
15 attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080  
ggcccagggc ttcccgggtat caacagggac accaggattt atttattctg cgaagtgatc 4140  
20 ttccgtcaca ggtatttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat 4200  
ttagtgatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agtcctgaa 4260  
aatctcgata actcaaaaaa tacgcccggt agtgatctta ttctattatg gtgaaagttg 4320  
25 gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat ttctgccaaa agttggccca gggcttcccg 4380  
gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggattt 4440  
30 tattcggcgc aaagtgcgtc gggtgatgct gccaaactac tgatttagtg tatgatggtg 4500  
tttttgaggt gctccagtgg cttctgtttc tatcagggtt ggatgatcct ccagcgcggg 4560  
gatctcatgc tggagtctt cggccacccc aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 4620  
35 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 4680  
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaactcg ctgcttgcaa 4740  
40 acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 4800  
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 4860  
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 4920  
45 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 4980  
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag 5040  
50 cccagcttg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100  
agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cggtaagcgg cagggtcgga 5160  
acaggagagc gcacgagggg gcttcagggt ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc 5220  
55 ggggttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 5280  
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacgggttcc tggccttttg ctggcctttt 5340  
60 gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400  
gagtggagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 5460  
gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggtc gattcattaa 5520  
65 tgcagctggc acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 5580  
gtgagttagc tcaactatta ggcacccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 5640

```

      ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700
5      gccaaagcttg catgcctgca                                         5720

      <210> 12
      <211> 24
      <212> DNA
10     <213> Corynebacterium glutamicum

      <220>
      <223> SEQ_ID_12_PYC14

15     <400> 12
      ccggcgaagt gtctgctcgc gtga                                         24

      <210> 13
20     <211> 18
      <212> DNA
      <213> Corynebacterium glutamicum

      <220>
25     <223> SEQ_ID_13_PYC15

      <400> 13
      accccgcccc agtttttc                                         18

30

      <210> 14
      <211> 7438
      <212> DNA
      <213> Corynebacterium glutamicum
35

      <220>
      <223> SEQ_ID_14_PK19_MOB

      <220>
40     <221> misc_feature
      <222> (1 )..(1422 )
      <223> SacB complement

      <220>
45     <221> misc_feature
      <222> (1423 )..(1885 )
      <223> PsacB complement

      <220>
50     <221> misc_feature
      <222> (1914 )..(2708 )
      <223> KanR

      <220>
55     <221> misc_feature
      <222> (3118 )..(3622 )
      <223> 5' pycA

      <220>
60     <221> misc_feature
      <222> (3863 )..(4039 )
      <223> Pgro

      <220>
65     <221> misc_feature
      <222> (4040 )..(4888 )
      <223> Teil pycA

```

<400> 14  
ttatttgtta actgttaatt gtccttggtc aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt 60  
5 cttgcctttg atgttcagca ggaagctcgg cgcaaactgt gattgtttgt ctgcgtagaa 120  
tctctgtttt gtcatatagc ttgtaatcac gacattgttt cctttcgctt gaggtacagc 180  
gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcggt aggatcaaga tccattttta acacaaggcc 240  
10 agttttgttc agcggcttgt atgggccagt taaagaatta gaaacataac caagcatgta 300  
aatatcggtta gacgtaatgc cgtcaatcgt ctttttgat ccgcgggagt cagtgaacag 360  
15 gtaccatttg ccgttcattt taaagacgtt cgcgcggtca atttcatctg ttactgtgtt 420  
agatgcaatc agcggtttca tcactttttt cagtgtgtaa tcacgtttta gctcaatcat 480  
accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt gcgtttttta tcgctttgca gaagtttttg 540  
20 actttcttga cggaagaatg atgtgctttt gccatagtat gctttgttaa ataaagattc 600  
ttcgccttgg tagccatctt cagttccagt gtttgcttca aataactaagt atttgtggcc 660  
tttatcttct acgtagttag gatctctcag cgtatggttg tcgcctgagc tgtagtggcc 720  
25 ttcatcgatg aactgctgta ctttttgata cgtttttccg tcaccgtcaa agattgattt 780  
ataatcctct acaccgttga tgttcaaaga gctgtctgat gctgatacgt taacttgtgc 840  
30 agttgtcagt gtttgtttgc cgtaatgttt accggagaaa tcagtgtaga ataaacggat 900  
ttttccgtca gatgtaaatg tggctgaacc tgaccattct tgtgtttggt cttttaggat 960  
agaatcattt gcatcgaatt tgtcgctgtc tttaaagacg cggccagcgt ttttccagct 1020  
35 gtcaatagaa gtttcgccga ctttttgata gaacatgtaa atcgatgtgt catccgcatt 1080  
tttaggatct ccggctaatt caaagacgat gtggtagccg tgatagtttg cgacagtgcc 1140  
40 gtcagcgttt tgtaatggcc agctgtccca aacgtccagg ctttttgagc aagagatatt 1200  
tttaattgtg gacgaatcaa attcaggaac ttgataattt tcattttttt gctgttcagg 1260  
gatttgcagc atatcatggc gtgtaatatg ggaaatgccg tatgtttcct tatatggctt 1320  
45 ttggttcgtt tctttcgcaa acgcttgagt tgcgcctcct gccagcagtg cggtagtaaa 1380  
ggtaataact gttgcttggt ttgcaaactt ttgatgttc atcgttcatg tctccttttt 1440  
50 tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc agccctcctg tttgaagatg gcaagttagt 1500  
tacgcacaat aaaaaaagac ctaaaatatg taaggggtga cgccaaagta tacactttgc 1560  
cctttacaca ttttaggtct tgcttcttcc atcagtaaca aaccgcgcg atttactttt 1620  
55 cgacctcatt ctattagact ctcgtttgga ttgcaactgg tctattttcc tcttttgttt 1680  
gatagaaaat cataaaagga tttgcagact acgggcctaa agaactaaaa aatctatctg 1740  
60 tttcttttca ttctctgtat tttttatagt ttctgttgca tgggcataaa gttgcctttt 1800  
taatcacaat tcagaaaata tcataatcct tcatttcact aaataatagt gaacggcagg 1860  
tatatgtgat ggggttaaaaa ggatcgatcc tctagcgaac cccagagtcc cgctcagaag 1920  
65 aactcgtaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa 1980  
agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg ccaagctctt cagcaatcct acgggttagcc 2040

aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa 2100  
5 aagcggccat tttccaccat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt cagcagcaga 2160  
tcctcgccgt cgggcatccg cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc 2220  
tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg ctcccatccg agtacgtgct 2280  
10 cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggcg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc 2340  
agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac 2400  
aggagatcct gccccggcac ttgcccgaat agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca 2460  
15 acgtcgagca cagctgcgca aggaacgcc gtctgggcca gccacgatag ccgcgtgcc 2520  
tcgtcttggg gttcattcag ggcaccggac aggtcggctt tgacaaaaag aaccggggcg 2580  
20 ccctgcgtg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag 2640  
tcatagccga atagcctctc cacccaagcg gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt 2700  
tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat 2760  
25 cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca 2820  
gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg cttgctgtcc ataaaaccgc ccagtctagc 2880  
30 tatcgccatg taagccact gcaagctacc tgctttctct ttgcgcttgc gttttccctt 2940  
gtccagatag cccagtagct gacattcatc cggggtcagc accgtttctg cggactggct 3000  
ttctacgtgt tccgcttctt ttagcagccc ttgcgccctg agtgcttgcg gcagcgtgaa 3060  
35 gctagatgca tgctcgagcg gccgccagtg tgatggatat ctgcagaatt cgcccttccg 3120  
gcgaagtgtc tgctcgctg attgtgcttc ctttggtac taaccacgc gccaatgac 3180  
40 gttccctgcg ccacggtttt gtgaagctgt tctgccgccg taactctggc ctgatcatcg 3240  
gtggtgtcgt ggtggcaccg accgcgtctg agctgacct accgatcgct gtggcagtga 3300  
ccaaccgtct gacagttgct gatctggctg ataccttcgc ggtgtacca tcattgtcag 3360  
45 gttcgattac tgaagcagca cgtcagctgg ttcaacatga tgatctaggc taatttttct 3420  
gagtccttaga ttttgagaaa acccaggatt gctttgtgca ctctggggtt ttcactttgt 3480  
50 taagcagttt tggggaaaag tgcaaagttt gcaaagttta gaaatatttt aagaggtaag 3540  
atgtctgcag gtggaagcgt ttaaagcgt taaacttggc caaatgtggc aacctttgca 3600  
aggtgaaaaa ctggggcggg gtaagggcga attccagcac actggcgccc gttactagct 3660  
55 tatcgccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggt gcgggcctct 3720  
tcgtatttac gccagctggc gaaaggggga tgtgtgcaa ggcgattaag ttgggtaacg 3780  
60 ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcaa cctgtggcgc 3840  
aacgctgtat ataacctgcg tacggcttaa agtttggtc ccatgtgaat ttttagcacc 3900  
ctcaacagtt gagtgctggc actctcgggg gtagagtgcc aaataggttg tttgacacac 3960  
65 agttgttcac ccgcgacgac ggctgtgctg gaaaccaca accggcacac acaaaatttt 4020  
tctcatggag ggattcatcg tgtcgactca cacatcttca acgcttccag cattcaaaaa 4080

gatcttggta gcaaaccgcg gcgaaatcgc ggtccgtgct ttccgtgcag cactcgaaac 4140  
5 cgggtgcagcc acggtagcta tttacccccg tgaagatcgg ggatcattcc accgctcttt 4200  
tgcttctgaa gctgtccgca ttggtaccga aggtcacca gtcaaggcgt acctggacat 4260  
cgatgaaatt atcgggtgcag ctaaaaaagt taaagcagat gccatttacc cgggatacgg 4320  
10 cttcctgtct gaaaatgccc agcttgcccg cgagtgtgcg gaaaacggca ttacttttat 4380  
tggcccaacc ccagagggtc ttgatctcac cggtgataag tctcgcgcg taaccgccgc 4440  
15 gaagaaggct ggtctgccag ttttgcgga atccacccc agcaaaaaca tcgatgagat 4500  
cgtaaaagc gctgaaggcc agacttacc catctttgtg aaggcagttg ccgggtggtg 4560  
cggacgcggt atgcgttttg ttgcttcacc tgatgagctt cgcaaattag caacagaagc 4620  
20 atctcgtgaa gctgaagcgg ctttcggcga tggcgcgga tatgtcgaa gtgctgtgat 4680  
taaccctcag catattgaag tgcagatcct tggcgatcac actggagaag ttgtacacct 4740  
ttatgaacgt gactgctcac tgcagcgtcg tcacaaaaa gttgtcgaaa ttgcccagc 4800  
25 acagcatttg gatccagaac tgcgtgatcg ctttgtgcg gatgcagtaa agttctgccg 4860  
ctccattggt taccagggcg cgggaaccaa gggcgaattc ctctggataa tcatcgcggt 4920  
30 agttacgagc ggcgcgaatg caagggcgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcctctaga 4980  
gtcgacctgc aggcattgcaa gcttgcgga atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 5040  
ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 5100  
35 ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 5160  
gtcgggaaac ctgctgtgcc agctgcatta atgaatcgcc caacgcgcgg ggagaggcgg 5220  
40 tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc 5280  
gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 5340  
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 5400  
45 ggcgcggttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg 5460  
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 5520  
50 tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc 5580  
ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtagg atctcagttc 5640  
gggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 5700  
55 ctgcgcctta tccggaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 5760  
actggcagca gccactggtg acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgtacaga 5820  
60 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc 5880  
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 5940  
caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 6000  
65 atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 6060  
acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttggg 6120

gtgggcgaag aactccagca tgagatcccc gcgctggagg atcatccagc cctgatagaa 6180  
 5 acagaagcca ctggagcacc tcaaaaacac catcatacac taaatcagta agttggcagc 6240  
 atcacccgac gcactttgcg ccgaataaat acctgtgacg gaagatcact tcgcagaata 6300  
 aataaatcct ggtgtccctg ttgataccgg gaagccctgg gccaaactttt ggcgaaaatg 6360  
 10 agacgttgat cggcacgtaa gaggttccaa ctttcacccat aatgaaataa gatcactacc 6420  
 gggcgatattt tttagattat cgagattttc aggagctgat agaaacagaa gccactggag 6480  
 15 cacctcaaaa acaccatcat aactaaatc agtaagttgg cagcatcacc cgacgcactt 6540  
 tgcgccgaat aaatacctgt gacggaagat cacttcgcag aataaataaa tcctggtgtc 6600  
 cctgttgata ccgggaagcc ctgggccaac ttttggcgaa aatgagacgt tgatcggcac 6660  
 20 gtaagagggtt ccaactttca ccataatgaa ataagatcac taccgggagc attttttgag 6720  
 ttatcgagat tttcaggagc tctttggcat cgtctctcgc ctgtccctc agttcagtaa 6780  
 25 tttcctgcat ttgcctgttt ccagtcggta gatattccac aaaacagcag ggaagcagcg 6840  
 cttttccgct gcataaccct gcttcggggc cattatagcg attttttcgg tatatccatc 6900  
 ctttttcgca cgatatacag gattttgcca aaggggtcgt gtagactttc cttggtgtat 6960  
 30 ccaacggcgt cagccgggca ggataggtga agtaggccca cccgcgagcg ggtgttcctt 7020  
 cttcactgtc ccttattcgc acctggcggg gctcaacggg aatcctgctc tgcgaggctg 7080  
 35 gccggctacc gccggcgtaa cagatgaggg caagcggatg gctgatgaaa ccaagccaac 7140  
 caggaagggc agcccaccta tcaaggtgta ctgccttcca gacgaacgaa gagcgattga 7200  
 ggaaaaggcg gcggcgcccg gcatgagcct gtcggcctac ctgctggccg tcggccaggg 7260  
 40 ctacaaaatc acgggcgtcg tggactatga gcacgtccgc gagggcgtcc cggaaaacga 7320  
 ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cggtggaatc gaaatctcgt gatggcaggt 7380  
 45 tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgctcg gtacccatcg gcattttctt ttgcgttt 7438

<210> 15  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 50 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
 <223> SEQ\_ID\_15

55 <400> 15  
 cccgggatcc gctagcggcg cgcggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

60 <210> 16  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum

65 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_16

<400> 16  
 tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

5 <210> 17  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>  
<223> SEQ\_ID\_17  
<400> 17  
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

15 <210> 18  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>  
<223> SEQ\_ID\_18  
<400> 18  
gagagggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

25 <210> 19  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>  
<223> SEQ\_ID\_19  
<400> 19  
gagagggcgcg ccgcgcaaag tcccgttgcg tgaa 34

35 <210> 20  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

40 <220>  
<223> SEQ\_ID\_20  
<400> 20  
gagagggcgcg ccgctcaagt cggcgaagcc acgc 34

45 <210> 21  
<211> 140  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>  
<223> SEQ\_ID\_21  
<400> 21  
tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60  
tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120  
tctagaccgc ggatttaaata 140

55 <210> 22  
<211> 140



<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

5 <220>  
<223> SEQ\_ID\_22

<400> 22  
gatcatttaa atccccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60  
10 tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120  
aggcctctcg agatttaaataat 140

15 <210> 23  
<211> 5091  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>  
<223> SEQ\_ID\_23\_PCLIK5MCS

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (469)..(1260 )  
<223> KanR

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1527)..(2387 )  
<223> Ori EC(pMB) complement

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2533)..(3207 )  
<223> Orf1

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3541)..(4662 )  
<223> Rep Protein

<400> 23  
45 tctgattaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggccccgtac cacgcgtcat atgactagtt 60  
cggacctagg gatatcgctg acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa ttgggaccc 120  
ctagacccgg gatttaaatac gctagcgggc tgctaaagga agcggaacac gtagaaagcc 180  
50 agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240  
gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgacgtg ggcttacatg gcgatagcta 300  
gactgggagg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360  
55 aaggttgagg agccctgcaa agtaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420  
cgaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat gattgaacaa 480  
60 gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540  
gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg 600  
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660  
65 gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgtgtgc 720  
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggccaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780

tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 840  
5 acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900  
cgtactcggg tggaagccgg tcttgatgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960  
ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgcgag cgaggatctc 1020  
10 gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 1080  
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 1140  
15 acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac 1200  
ggatcgcggt cctccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagtctctc 1260  
tgagcgggac tctgggggtt gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320  
20 atttcgattc caccgcgcgc tctatgaaa gggtgggctt cggaatcggt ttccgggacg 1380  
ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440  
gcgcgccggc cggcccgggt tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac 1500  
25 aggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 1560  
gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620  
30 ggaaagaaca tgtgagcaa aggccagca aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680  
ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 1740  
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc 1800  
35 ctgctgcgct ctctgttcc gaccctgcg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860  
tcgggaagcg tggcgcttct tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920  
40 gtctgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta 1980  
tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040  
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100  
45 tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160  
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaac caccgctggt 2220  
50 agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa 2280  
gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg 2340  
55 attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ggccggccgc 2400  
ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460  
ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520  
60 gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580  
gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640  
tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700  
65 ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760  
atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcgc 2820

gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880  
5 cagcccgagg agctggaggc ggctaggtcg caaatggcgc tggaagtgcg tcccccgagc 2940  
gaaattttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000  
gcggtgcccc caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060  
10 aggacgtgtc agcgcgcgca ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120  
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180  
15 gtgagcggta actcacaggc cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgtc 3240  
aaaaatgact ctagecgatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300  
tctgttcgac acccatcccc agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360  
20 ccggaattc ctcgctcacc tgggcagaga aaatttcag ggcagcaaga cccgcgactt 3420  
cgccagcgtc tggatcaaag acccgacac ggagaaacac agccgaagt ataccgagtt 3480  
25 ggttcaaaat cgcttgcccc gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540  
gtgcttgtcc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600  
aaccgagcgg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660  
30 atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720  
gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780  
acccgcgttt tcggcgctga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg cactgcact 3840  
35 ctccgacgat ccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900  
gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaaa acgctatgag 3960  
40 caggagtttt ctageggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020  
aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgcgc ctgaagcgtc tggagagctg 4080  
atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccaggggcgt ccgcccgtga tgagacggct 4140  
45 tttcgccacg ctttgactgt gggataccag taaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200  
accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggc cgaggaggc 4260  
50 cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac gccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320  
ggctacgtcg cttaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380  
ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440  
55 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500  
caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcaggttg gtttatgact 4560  
60 gttgaggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620  
tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cagaggacg 4680  
ccgaaagctt ccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740  
65 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800  
acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctcgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860

caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaattt 4920  
 cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980  
 5 tggattctta cegtggaaat tcttcgcaaa aatcgctccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040  
 gcgtcggtgc cgctgggtgc gcttggettgc accgacttga tcagcggccg c 5091  
 10  
 <210> 24  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 15  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_24  
 <400> 24  
 20 gcgcggtacc tagactcacc ccagtgc 28  
 <210> 25  
 <211> 30  
 25 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_25  
 30 <400> 25  
 ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30  
 35 <210> 26  
 <211> 6349  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 40 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_26\_PCLIKSMCS\_PMETA\_META  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (42 )..(177 )  
 <223> Pmeta  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (178 )..(1311 )  
 <223> meta  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1727 )..(2518 )  
 <223> KanR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (2785 )..(3645 )  
 <223> Orf1  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 65 <222> (3791 )..(4465 )  
 <223> Ori-Ec (pMB) complement  
 <220>

<221> misc\_feature  
<222> (4799)..(5920 )  
<223> Rep Protein

5 <400> 26  
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgttac ctagactcac cccagtgcctt 60  
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120  
10 tccatataca ctggacgaag ttttagtcctt gtccacccag aacaggcggt tattttcatg 180  
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240  
15 gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta 300  
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360  
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggc cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420  
20 tgcgtgatct gtaccaacgt catcggtggc tgcaacggtt ccaccggacc tggctccatg 480  
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc tccccgccg cgtccattcg tgatcaggta 540  
aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggc 600  
25 ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtaccaga aactgttggc 660  
gcagctgctg ttcttgagc ttctgcacgc gccagcgctt ggcaaatcgg cattcaatcc 720  
30 gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780  
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 840  
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 900  
35 ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttggc ctaccaagca 960  
gacaagctag tacagcgttt cgacgcggc tctactgtct tgctcaccga cgcctcaac 1020  
40 cgccacgaca ttggtcgca ccgcgaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080  
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140  
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgcgggccac 1200  
45 gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaaatg gatcgcatcg tgaggaaact cttcagcctc 1260  
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagtctg 1320  
50 gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380  
agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaagggaag cggaacacgt agaaagccag 1440  
tccgcagaaa cgggtgtgac cccggatgaa tgcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500  
55 aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560  
ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgccg gctggggcgc cctctggtta 1620  
60 ggttggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaaagga tctgatggcg 1680  
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctcgatga ttgaacaaga 1740  
tggaattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800  
65 acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgtgttcggc ctgtcagcgc aggggcgccc 1860  
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920

gcggctatcg tggctggcca cgacgggagt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac 1980  
5 tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2040  
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100  
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg 2160  
10 tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220  
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2280  
15 cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg 2340  
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac 2400  
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460  
20 tategccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520  
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580  
ttcgattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640  
25 ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 2700  
gcgcggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760  
30 gcgtcttcc gcttcctcgc tctactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgccgagcgc 2820  
ggatcagct cactcaaagg cggtaatcgc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880  
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940  
35 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000  
gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060  
40 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct tacccgatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120  
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggatc ctgagttcgg tgtaggctcg 3180  
tcgtccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttctc 3240  
45 cggttaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300  
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 3360  
50 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 3420  
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480  
55 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3540  
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaa gaaaactcac gtttaaggat 3600  
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg ccggccgcgg 3660  
60 ccgcgcaaag tcccgttcg tgaataatct cgtgccgctg gatcttcgc caaaaacttt 3720  
aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780  
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 3840  
65 cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900  
acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960

ggctgacgag ctgctgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020  
5 cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgagag gacggcgcg 4080  
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140  
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200  
10 aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260  
ggtgcccgcg ggcatacaca acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320  
15 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcg gtcgaaaaag 4380  
cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440  
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgtcaa 4500  
20 aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaatct tccgtgatc 4560  
tgttcgacac ccatcccgag ctgcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620  
gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680  
25 ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat accgagttgg 4740  
ttcaaaatcg cttgcccggt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800  
30 gcttgctctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860  
ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920  
cggcgatgaat cactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgac cggtgtatgc 4980  
35 cgagcagggc atgagcagcc cgaatatgcy cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040  
ccgcgttttc ggcgtgacc aggttttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100  
40 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160  
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa ctaaaaaaac gctatgagca 5220  
ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280  
45 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340  
cgacggcgct cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgc gcccgatgat agacggcttt 5400  
50 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460  
caagggtcat cgagcctacg agcgtgcta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520  
tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580  
55 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640  
gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700  
60 gaaagaccca aacagttagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760  
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt 5820  
tgaggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880  
65 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940  
gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggcttc 6000

tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060  
5 accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6120  
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180  
tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240  
10 gattcttacc gtggaaattc ttgcacaaaa tcgtcccttg atcgcccttg cgacgttggc 6300  
gtcgggtgccg ctgggtgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

15 <210> 27  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>  
<223> SEQ\_ID\_27

<400> 27  
25 gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

<210> 28  
<211> 41  
<212> DNA  
30 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_28

35 <400> 28  
cctgaaggcg cgagggtggg catgatgaat ccctccatga g 41

<210> 29  
40 <211> 19  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
45 <223> SEQ\_ID\_29

<400> 29  
cccaccctcg cgccttcag 19

50 <210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

55 <220>  
<223> SEQ\_ID\_30

<400> 30  
60 ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 31  
65 <211> 6372  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>



```

<223> SEQ_ID_31_PCLIKSMCS_PGROESMETA

<220>
<221> misc_feature
5 <222> (3 )..(179 )
   <223> Pgro

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (180 )..(1313 )
   <223> metaA

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1735 )..(2526 )
   <223> KanR

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (2793 )..(3653 )
   <223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (3799 )..(4473 )
   <223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (4807 )..(5928 )
   <223> Rep Protein

<400> 31
35 agcggcttaa agtttggtcg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgctggc 60
   actctcgggg gtagagtgcc aaataggttg tttagacacac agttgttcac ccgcgacgac 120
   ggctgtgctg gaaaccacac accggcacac acaaaatttt tctcatggag ggattcatca 180
40 tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcgggtgat gtctccaccg 240
   aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt gaataccgcg 300
   tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca 360
45 acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt 420
   actgcgtgat ctgtaccaac gtcacgtgtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca 480
50 tgcattcaga tggaaatttc tggggtaatc gtttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg 540
   taaacgccga aaaacaattc ctgcagcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg 600
   gtggttccat ggggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtacca gaaactgttg 660
55 gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaadc ggcattcaat 720
   ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat 780
60 ccggtcgcaa ccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgccac ctcacctacc 840
   gtggcgaaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac gaaaaccac 900
   tcggtcccta ccgaagccc gaccagcgtt tcgcegtgga atcctacttg gactaccaag 960
65 cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccc gctcctacgt cttgctcacc gacgccctca 1020
   accgccacga cattggctcg gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa tccatcaaag 1080

```

ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac cagcaagaac 1140  
5 acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgatatcc cctgtcggcc 1200  
acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaaac ttcttcagcc 1260  
tcattctccc agacgaagac aaccttcga cctacatcga gttctacatc taacatatga 1320  
10 ctagtctcga cctagggata tcgtcgacat cgatgctctt ctgcgttaat taacaattgg 1380  
gatcctctag acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag 1440  
15 aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg 1500  
acaagggaac acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga 1560  
tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc 1620  
20 tctggttaag ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaaggatc 1680  
tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt 1740  
gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat 1800  
25 gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccc tgttccggct gtcagcgag 1860  
gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac 1920  
30 gaggcagcgc ggctatctg gctggccacg acgggcgctt cttgcgcagc tgtgctcgac 1980  
gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggag aagtgccggg gcaggatctc 2040  
35 ctgtcatctc accttgetcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg 2100  
ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaacaa tcgcatcgag 2160  
cgagcacgta ctggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat 2220  
40 caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggtcaagg cgcgcagccc cgacggcgag 2280  
gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc 2340  
45 ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg 2400  
ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg 2460  
ctttacggta tcgcgctcc cgattcgcag cgcacgcct tctatcgctt tcttgacgag 2520  
50 ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat 2580  
cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc 2640  
55 gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagtcc ttcgccacg 2700  
ctagcggcgc gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 2760  
cgcatcaggc gctcttcgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg 2820  
60 cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat 2880  
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc 2940  
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 3000  
65 tcaagtcaga ggtggcgaac cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga 3060  
agctccctcg tgcgctctcc tgttcggacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt 3120

ctcccttcg9 gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgg9g 3180  
taggtcg9tc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 3240  
5 gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 3300  
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgg9gc tacagagt9c 3360  
10 ttgaagtgg9t ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 3420  
ctgaagccag ttaccttcg9 aaaaagag9t g9tagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3480  
gctgg9tagcg gtgg9ttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgca9aaa aaaaggatct 3540  
15 caagaagatc ctttgatctt ttctacgg9g tctgacgctc agtgg9aacga aaactcacgt 3600  
taagg9attt tgg9catgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc 3660  
20 ggccg9ggcc gcgcaaagtc ccgcttcg9t aaaattttcg tgcg9cgtga ttttcg9cca 3720  
aaaactttta cgaacgttcg ttataatgg9t gtcatgacct tcacgacgaa gtactaaaat 3780  
tggcccgaat catcagctat ggatctctct gatgtcg9c tggagtccga cgcgctcgat 3840  
25 gctgcccgtc9 atttaaaac ggtgatcgga tttttcg9 ctctcgatac gacggacg9c 3900  
ccagcatcac gagactgg9c cagtgcg9c agcgacctag aaactctcgt gg9g9atctt 3960  
30 gaggagctg9 ctgacgagct gcgtgctc9 ccagcgccag gaggacgcac agtagtg9gag 4020  
gatgcaatca gttgcgcta ctgcggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga 4080  
cg9cg9caa aatattgctc agatgcgtgt cgtgcg9cag ccagccg9ga gc9cg9caac 4140  
35 aaacgccacg ccgaggagct ggag9cg9ct aggtcg9aaa tggcg9tgg9 agtgcgtccc 4200  
ccgagcg9aaa ttttg9ccat ggtcgtcaca gagctggaag cg9cagcgag aattatcg9c 4260  
40 atcgtgg9cg9 tgcccgcag9 catgacaaac atcg9taa9t ccg9gtttcg9 tgtgcccgtg9 4320  
ccgcccagga cgtgtcag9c ccgccaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcg9cgt 4380  
cg9aaaagcg cacaggcg9c aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttgaa 4440  
45 cgccc9tga gcggtaa9c acaggcg9c gg9taacccc cagtccaaac ctgggagaaa 4500  
gcgtcaaaa atgactctag cggattcacg agacattgac acaccggcct gg9aat9ttc 4560  
50 cgctgatctg ttcgacaccc atccc9agct cg9cgtcg9a tcacgtggct gg9c9agcga 4620  
agaccgccc9 gaattcctc9 ctacactgg9 cagagaaaat ttccagg9ca gcaagacc9g 4680  
cgacttcg9c agcgcttgga tcaaagaccc gg9cacgg9g aaacacagcc gaagt9tatac 4740  
55 cg9gttg9tt caaaatcgct tgcccgg9tc cagtatgtt9 ctctgacg9a cg9c9agc9c 4800  
gc9ccg9tc ttgtcctgga cattgatgtg ccg9ccacc aggcgg9cg9 gaaaatcg9g 4860  
60 cacgt9aaac ccgagg9cta cg9attttg9 gagcg9tgg9 cacgcctgga aaaagcg9ca 4920  
gcttg9atcg9 gcgtgaatcc actgagcg9g aaatgccagc tcatctgg9c cattgatccg 4980  
gtgtatg9cg9 cagcagg9cat gagcagccc9 aatatgc9c tgctgg9ctg9 aacgaccg9g 5040  
65 gaaatg9ccc gcgttttcg9 cg9tgaccag gctttttcac atagg9ctg9 ccgtgg9cc9c 5100  
tgcactctcc gacgatccca gccgtacc9c tgg9catg9cc agcacaatcg9 cgtgg9atcg9 5160

ctagctgatac ttatggaggt tgctcgcatac atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc 5220  
 5 tatgagcagg agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg 5280  
 gaagcaaaag cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgccgctga agcgtctgga 5340  
 gagctgatac acggcgctccg tgcctcttgg actgctccag ggcgtgccgc ccgtgatgag 5400  
 10 acggcttttc gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccca 5460  
 aaagacacca agggatcatc agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggcggctcga 5520  
 15 ggagggcgtg agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt 5580  
 gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctctcagac agagacgcag 5640  
 agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca 5700  
 20 gaacgtgga aagacccaaa cagtgtatc gcccgagcac agcgagaaaa actagctaag 5760  
 tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt 5820  
 atgactgttg agggagagac tggtcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt 5880  
 25 agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca cttaaggtct gcgggcattg aacttccacg 5940  
 aggacgccga aagcttccca gtaaattgtc catctcgtag gcagaaaacg gttccccctg 6000  
 30 aggtgtcttc tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg 6060  
 gggctcacac cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac 6120  
 tgctcccaaa gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaaagcct tgccccgcgg 6180  
 35 aaatttcttc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaaag cttctttcac cctaaattcg 6240  
 agagattgga ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccctgat cgcccttgcg 6300  
 40 acgttggcgt cggtgccgct gggtgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgctcg 6360  
 atttaaatct cg 6372

45 <210> 32  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_32  
 <400> 32  
 ggatctagag ttctgtgaaa aacaccgtg 29

55 <210> 33  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 60 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_33  
 65 <400> 33  
 gcgactagtg cccacaaat aaaaaacac 29

<210> 34  
 <211> 5156  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 5  
 <220>  
 <223> SEQ\_ID\_34  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (121)..(190 )  
 <223> GroEL Terminator  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (534)..(1325 )  
 <223> KanR  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1592)..(2452 )  
 <223> Ori-EC(pMB) complement  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2598)..(3272 )  
 <223> Orf1  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3606)..(4727 )  
 <223> Rep Protein  
 35  
 <400> 34  
 tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgttac cacgcgtcat atgactagtt 60  
 cggacctagg gatatcgtag acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatacct 120  
 ctagagttct gtgaaaaaca ccgtggggca gtttctgctt cgcggtgttt tttattttgtg 180  
 40  
 gggcactaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 240  
 aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 300  
 45  
 caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 360  
 agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt 420  
 ctggttaagg ttgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 480  
 50  
 gatggcgtag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcattgattg 540  
 aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttggtt ggagaggcta ttcggctatg 600  
 55  
 actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 660  
 ggcgcccgtt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 720  
 aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 780  
 60  
 ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 840  
 tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 900  
 65  
 tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcacgcagc 960  
 gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 1020

aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgccca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 1080  
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 1140  
5 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 1200  
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttcctcgtgc 1260  
10 tttacggtat cggcgtctcc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt 1320  
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 1380  
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 1440  
15 ggacgccggc tggatgatec tccagcgagg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 1500  
tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 1560  
gcatcaggcg ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 1620  
20 ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 1680  
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1740  
25 cggtgctggc gtttttccat aggtctcgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1800  
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa 1860  
gctccctcgt gcgctctct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc 1920  
30 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 1980  
aggctgctcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 2040  
35 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttag acacgactta tcgccactgg 2100  
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagttct 2160  
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tcgctctgc 2220  
40 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 2280  
ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgagaaaa aaaggatctc 2340  
45 aagaagatcc tttgatctt tctacggggc ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 2400  
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 2460  
gccgcggccg cgcaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgt gccgcgtgat tttccgcaa 2520  
50 aaactttaac gaacgttcgt tataatgggt tcatgacct cagcaggaag tactaaaatt 2580  
ggcccgaatc atcagctatg gatctctct atgtcgcgct ggagtcggac gcgctcgatg 2640  
55 ctgccgtcga tttaaaaacg gtgatcggat ttttccgagc tctcgatacg acggacgcgc 2700  
cagcatcacg agactgggccc agtgccgcga gcgacctaga aactctcgtg gcggatcttg 2760  
aggagctggc tgacgagctg cgtgctcggc cagcgccagg aggacgcaca gtagtggagg 2820  
60 atgcaatcag ttgcgcctac tgcggtggcc tgattcctcc ccggcctgac ccgcgaggac 2880  
ggcgcgcaaa atattgctca gatgcgtgtc gtgccgcagc cagccgcgag cgcgccaaca 2940  
65 aacgccacgc cgaggagctg gaggcggcta ggtcgcaaat ggcgctggaa gtgcgtcccc 3000  
cgagcgaaat tttggccatg gtcgtcacag agctggaagc ggcagcgaga attatcgca 3060

tcgtggcgggt gcccgagggc atgacaaaca tcgtaaatgc cgcgtttcgt gtgccgtggc 3120  
cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgtc 3180  
5 gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatgttgaac 3240  
gccccgtgag cggtaactca cagggcgctcg gctaaccctc agtcctaaacc tgggagaaaag 3300  
10 cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc 3360  
gctgatctgt tcgacaccca tcccagctc gcgctgcat cactgtggtg gacgagcgaa 3420  
gaccgcccgc aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag caagaccgcg 3480  
15 gacttcgcca gcgcttgat caaagaccgc gacacggaga aacacagccg aagttatacc 3540  
gagttgggtc aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgttg tctgacgcac gcgcagcacg 3600  
20 cagccgtgct tgcctggac attgatgtgc cgagccacca ggccggcggg aaaatcgagc 3660  
acgtaaaccg cgaggtctac gcgattttgg agcgtgggc acgcctggaa aaagcgccag 3720  
cttgatcggc cgtgaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg 3780  
25 tgtatgccgc agcagggcatg agcagcccga atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg 3840  
aaatgaccgc cgttttcggc gctgaccagg ctttttcaca taggctgagc cgtggccact 3900  
gcactctccg acgatcccag ccgtaccgtt ggcatgccc gcacaatcgc gtggatcgcc 3960  
30 tagctgatct tatggaggtt gctcgcatga tctcaggcac agaaaaacct aaaaaacgct 4020  
atgagcagga gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactgcgg 4080  
35 aagcaaaagc acttgccacg cttgaagcaa gcctgccgag cgccgctgaa gcgtctggag 4140  
agctgatcga cggcgctcgt gtcctctgga ctgctccagg gcgtgccgcc cgtgatgaga 4200  
40 cggcttttcg ccacgctttg actgtgggat accagttaaa agcggctggg gagcgctaa 4260  
aagacaccaa gggtcacga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgctcag gcggtcggag 4320  
gaggccgtga gcctgatctg ccgcccggact gtgaccgcca gacggattgg ccgcgacgtg 4380  
45 tgccgcggcta cgtcgctaaa ggccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga 4440  
gccagccgag gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgag 4500  
aacgctggaa agacccaaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaaa ctagctaagt 4560  
50 ccagtcaacg acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca ggttggttta 4620  
tgactgttga gggagagact ggctcgtggc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta 4680  
55 gcgtgtcacg tcagaccgtg aatagagcac ttaaggtctg cgggcattga acttcacga 4740  
ggacgccgaa agcttcccag taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg tcccccgta 4800  
60 gggctctctc cttggcctcc tttctaggct gggctgatg ctcttgaagc tctctagggg 4860  
ggctcacacc ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctcgtaagcg cacaaggact 4920  
gtcccaaaag atcttcaaag ccactgccgc gactgccttc gcgaagcctt gccccgcgga 4980  
65 aatttcctcc accgagttcg tgacaccccc tatgccaagc ttctttcacc ctaaattcga 5040  
gagattggat tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaatcg tcccctgatc gcccttgcca 5100

cgttggcgctc ggtgccgctg gttgcgcttg gcttgaccga cttgatcagc ggccgc 5156

5 <210> 35  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>  
<223> SEQ\_ID\_35

<400> 35  
gagacatatg cccaccctcg cgccttcagg 30

15 <210> 36  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>  
<223> SEQ\_ID\_36

<400> 36  
25 ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

<210> 37  
<211> 6287  
30 <212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
35 <223> SEQ\_ID\_37\_PCLIK5MCS\_META\_OHNE\_STARTCODON

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (54 )..(1184 )  
<223> MetA without startcodon

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1252 )..(1321 )  
<223> GroEL Terminator

45 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1665 )..(2456 )  
<223> KanR

50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2723 )..(3583 )  
<223> Ori-EC(pMB) complement

55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3729 )..(4403 )  
<223> Orf1

60 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4737 )..(5858 )  
<223> REP Protein

65 <400> 37  
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag cagcgatcat atgcccaccc 60



tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc gaagccggag 120  
caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc gtagataaag 180  
5 aaggacgcag caatgtcgtt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc aacgcagccg 240  
attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt tactgcgtga 300  
10 tctgtaccaa cgtcacggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc atgcatccag 360  
atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag gtaaaccgag 420  
aaaaacaatt cctcgacgca ctccgcatca ccacggctgc cgcagtactt ggtggttcca 480  
15 tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactgtt ggcgcagctg 540  
ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa tccgccaaa 600  
20 ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa tccggctgca 660  
accagccac cggactcggc gccgcccagc gcacgcacca cctcacctac cgtggcgaac 720  
tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaacca ctcggtccct 780  
25 accgcaagcc cgaccagcgc ttcccggtgg aatcctactt ggactaccaa gcagacaagc 840  
tagtacagcg ttccgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgaagccctc aaccgccagc 900  
acattggctc cgaccgcgga ggctcaaca aggcactcga atccatcaaa gttccagtc 960  
30 ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt accctacca ccagcaagaa cacctctcca 1020  
gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgatc ccctgtcggc cagcatgctt 1080  
35 tcctcacga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc ctcatctccc 1140  
cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaactagt tcggacctag 1200  
ggatcctgc gacatcgatg ctcttctcgc ttaattaaca attgggatcc tctagagttc 1260  
40 tgtgaaaaac accgtggggc agtttctgct tcgcggtgtt ttttatttgt ggggcactag 1320  
accggggatt taaatcgcta ggggctgct aaaggaagcg gaacacgtag aaagccagtc 1380  
45 cgcagaaacg gtgctgacct cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg acaagggaaa 1440  
acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga tagctagact 1500  
gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggttaag 1560  
50 ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaagatc tgatggcgca 1620  
ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg 1680  
55 gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac 1740  
aacagacaat cggctgctct gatgccgccc gttccggct gtcagcgag gggcgccc 1800  
60 ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc 1860  
ggctatctg gctggccacg acggcgcttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg 1920  
aagcgggaag ggactggctg ctattgggag aagtgcgggg gcaggatctc ctgtcatctc 1980  
65 accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc 2040  
ttgatccggc tacctgccc aacgacacc aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta 2100

ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg 2160  
cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcagcc cgacggcgag gatctcgtcg 2220  
5 tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggtgga aaatggccgc ttttctggat 2280  
tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc 2340  
10 gtgatattgc tgaagagctt ggccggcaat gggctgaccg ctctctcgtg ctttacggta 2400  
tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct tctatgcct tcttgacgag ttcttctgag 2460  
cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgcgccc aacctgccat caccagatct 2520  
15 cgattccacc gccgccttct atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc gggacgcccg 2580  
ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagtcc ttcgccacg ctagcgccgc 2640  
gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc 2700  
20 gctcttcgcg ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg 2760  
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 2820  
25 agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 2880  
cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga 2940  
gggtggcga cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg 3000  
30 tgcgctctcc tgttcgcacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 3060  
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagtccggtg taggtcgttc 3120  
35 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 3180  
gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 3240  
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggc 3300  
40 ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatgtggtat ctgcgctctg ctgaagccag 3360  
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg 3420  
45 gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 3480  
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacg aaactcacgt taagggattt 3540  
tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc ggccgcggcc 3600  
50 gcgcaaagtc ccgcttcgtg aaaattttcg tgcgcggtga ttttcgcca aaaacttta 3660  
cgaacgttcg ttataatggt gtcacgacct tcacgacgaa gtactaaaat tggcccgaat 3720  
55 catcagctat ggatctctct gatgtcgcgc tggagtccga cgcgctcgat gctgccgtcg 3780  
atataaaaac ggtgatcggg tttttccgag ctctcgatac gacggacgcg ccagcatcac 3840  
gagactgggc cagtgccgcg agcgacctag aaactctcgt ggcggatctt gaggagctgg 3900  
60 ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcgcag gaggacgcac agtagtgag gatgcaatca 3960  
gttgcccta ctgcggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga cggcgcgcaa 4020  
65 aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgcag ccagccgcga gcgcgccaac aaacgccacg 4080  
ccgaggagct ggaggcggct aggtcgcaaa tggcgctgga agtgcgctccc ccgagcgaaa 4140

ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcgag aattatcgcg atcgtggcgg 4200  
tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaatg ccgcgtttcg tgtgccgtgg ccgcccagga 4260  
5 cgtgtcagcg ccgccaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcgcgt cgaaaaagcg 4320  
cacaggcggc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttgaa cgccccgtga 4380  
10 gcggtaaactc acagggcgct ggctaacccc cagtccaaac ctgggagaaa gcgctcaaaa 4440  
atgactctag cggattcacg agacattgac acaccggcct ggaaattttc cgctgatctg 4500  
ttcgacaccc atcccagct cgcgctgcga tcacgtggct ggacgagcga agaccgccgc 4560  
15 gaattcctcg ctacactggg cagagaaaat ttccaggga gcaagaccg cgacttcgcc 4620  
agcgcttgga tcaaagaccg ggacacggag aaacacagcc gaagttatac cgagttggtt 4680  
caaaatcgct tgcccgggtc cagtatgttg ctctgacgca cgcgcagcac gcagccgtgc 4740  
20 ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcgag cacgtaaacc 4800  
ccgaggcteta cgcgattttg gagcgctggg cacgcctgga aaaagcgcca gcttgatcg 4860  
25 gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcacttggtt cattgatccg gtgtatgccg 4920  
cagcaggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc aacgaccgag gaaatgaccc 4980  
gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag ccgtggccac tgcactctcc 5040  
30 gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc ctagctgatc 5100  
ttatggaggt tgctcgcatg atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc tatgagcagg 5160  
35 agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg gaagcaaaag 5220  
cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgccgtga agcgtctgga gagctgatcg 5280  
acggcgctccg tgctctctgg actgctccag ggcgtgccgc ccgtgatgag acggcttttc 5340  
40 gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta aaagacacca 5400  
agggtcacg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgtca ggccggtcgga ggaggccgtg 5460  
45 agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt gtgcgcggct 5520  
acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctctgcagac agagacgcag agccagccga 5580  
ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca gaacgctgga 5640  
50 aagacccaaa cagtgagtag gcccgagcac agcgagaaaa actagctaag tccagtcaac 5700  
gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt atgactgttg 5760  
55 agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt agcgtgtcac 5820  
gtcagaccgt gaatagagca ctttaaggtct gcgggcattg aacttcacg aggacgccga 5880  
aagcttccca gtaaattgtc catctcgtag gcagaaaacg gttccccgt agggctctctc 5940  
60 tcttgccctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg gggctcacac 6000  
cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac tgctcccaaa 6060  
65 gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct tgcccccgcg aaatttcctc 6120  
caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaaag cttctttcac cctaaattcg agagattgga 6180

ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccttgat cgcccttgcg acgttggcgt 6240  
cggtgccgct gggtgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgc 6287

5  
<210> 38  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

10  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_38\_OLIGONUKLEOTIDPRIMER\_1701

15  
<400> 38  
gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

20  
<210> 39  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

25  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_39\_OLIGONUKLEOTIDPRIMER\_1828

<400> 39  
ctctcatatg caatccctcc atgagaaaa tt 32

30  
<210> 40  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

35  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_40\_OLIGONUKLEOTIDPRIMER\_1831

<400> 40  
ctctcatatg cgcggccgca atccctccat gagaaaaatt 40

40  
<210> 41  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

45  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_41\_OLIGONUKLEOTIDPRIMER\_1832

50  
<400> 41  
ctctcatatg caatctctcc atgagaaaa ttttgtgtg 39

55  
<210> 42  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

60  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_42\_OLIGONUKLEOTIDPRIMER\_1833

<400> 42  
ctctcatatg caatctctc atgagaaaa ttttgtgtg 39

65  
<210> 43  
<211> 39  
<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ\_ID\_43\_OLIGONUKLEOTIDPRIMER\_1834

5 <400> 43  
ctctcatatg caatcccttc atgagaaaaa ttttgtgtg 39

10 <210> 44  
<211> 2961  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

15 <220>  
<223> SEQ\_ID\_44\_PBS\_KS+

<400> 44

20 ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60  
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120  
gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180

25 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240  
ctaatacagt tttttggggt cgagggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag 300  
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360

30 agcgaaagga gcggcgctta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420  
cacaccgcc gcgttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg 480

35 caactgttgg gaaggcgat cggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540  
gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagcttg 600  
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca 660

40 ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa 720  
gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg gcccggtacc cagcttttgt tccctttagt 780

45 gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctgtg tgaaattgtt 840  
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg 900  
cctaatagag gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg 960

50 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc 1020  
gtattgggag ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 1080

55 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 1140  
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc cagggaaccgt aaaaaggccg 1200  
cgttgctggc gtttttccat aggtccgccc ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1260

60 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa 1320  
gctccctcgt gcgtctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc 1380

65 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 1440  
aggtcggttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1500

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 1560  
 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgt acagagttct 1620  
 5 tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc 1680  
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1740  
 10 ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1800  
 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 1860  
 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa 1920  
 15 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 1980  
 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagtgtgct 2040  
 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgtgtg 2100  
 20 caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2160  
 ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2220  
 25 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg 2280  
 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2340  
 gtcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaa gcggttagct 2400  
 30 ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca ctcatgggta 2460  
 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2520  
 35 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2580  
 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 2640  
 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 2700  
 40 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2760  
 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaggg aataagggcg acacggaaat 2820  
 45 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 2880  
 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 2940  
 catttccccg aaaagtgcc a 2961  
 50

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 6431

&lt;212&gt; DNA

55 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_45\_PCLIK5MCS\_PGRO\_1701\_1828\_META

60 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (726)..(899)

&lt;223&gt; P1701/1828

65 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (906)..(2036)

&lt;223&gt; MetA without startcodon

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2104)..(2173 )  
 5 <223> GroEL Terminator  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2517)..(3308 )  
 10 <223> KanR  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3575)..(4435 )  
 15 <223> Ori-EC(pMB) complement  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4581)..(5255 )  
 20 <223> Orf1  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5589)..(279 )  
 25 <223> REP Protein  
  
 <400> 45  
 aggcgaaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggtg aaaaggccgc agaacgctgg 60  
 30 aaagacccaa acagtgagta cgcccagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120  
 cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttggtt tatgactgtt 180  
 gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240  
 35 cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggtc tgcgggcatt gaacttcac gaggacgccg 300  
 aaagcttccc agtaaatgtg ccatctcgta ggcagaaaac ggttcccccg tagggctctt 360  
 40 ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420  
 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480  
 agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttcct 540  
 45 ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600  
 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660  
 50 tcggtgccgc tggttgcgct tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaate 720  
 tcgagcggct taaagttagg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgtc 780  
 ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttggt caccgcgcac 840  
 55 gacggctgtg ctggaaacct acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gagggattgc 900  
 atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960  
 60 ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgccca tcaccgctgg ggtgaatacc 1020  
 gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgccctc actggagatt 1080  
 ccaacgcagc cgattgggtg gctgacttgc tcgggtcccg caaagccatc aacactgata 1140  
 65 tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200  
 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggtg atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260

aggtaaacgc cgaaaaacaa ttcctcgacg cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320  
5 ttggtgggtc catgggtggt gcccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380  
ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcctggcaa atcggcattc 1440  
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500  
10 aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgcgcgccg acgcatcgcc cacctcacct 1560  
accgtggcga actagaaatc gacgaacgct tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620  
15 cactcggctc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgccgt ggaatcctac ttggactacc 1680  
aagcagacaa gctagtacag cgtttcgcg cccggtccta cgtcttgctc accgacgccc 1740  
tcaaccgcca cgacattggt cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800  
20 aagttccagt ccttgctcga ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860  
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920  
25 gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980  
gcctcatctc ccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040  
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat 2100  
30 cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcggtg ttttttattt 2160  
gtggggcact agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaagggaag cggaacacgt 2220  
35 agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280  
ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340  
gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400  
40 cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460  
tctgatggcg caggggatca agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcacga 2520  
45 ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cgccgcctg ggtggagagg ctattcggct 2580  
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccg cgtgttccg ctgtcagcgc 2640  
aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccg tgccctgaat gaactgcagg 2700  
50 acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg 2760  
acgttgctac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820  
55 tcctgtcatc tcacctgtc cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880  
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg 2940  
agcagcacg tactcgatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000  
60 atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgatg cccgacggcg 3060  
aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgctt gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120  
65 gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180  
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240  
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg 3300



agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360  
5 atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420  
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca 3480  
cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540  
10 accgcatcag gcgctcttcc gcttctctcg tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600  
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg 3660  
15 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720  
ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780  
gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840  
20 gaagctccct cgtgcgtctc cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct 3900  
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggatc ctcagttcgg 3960  
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 4020  
25 gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac 4080  
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt 4140  
30 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc 4200  
tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260  
ccgcgtgtag cgggtggttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat 4320  
35 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380  
gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg 4440  
40 ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgccttc tgaaaatttt cgtgccgctg gattttccgc 4500  
caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560  
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620  
45 atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gattttccg agctctcgat acgacggacg 4680  
cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggtac 4740  
50 ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800  
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcgggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag 4860  
gacggcgcg c aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca 4920  
55 acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggctcga aatggcgctg gaagtgcgtc 4980  
ccccgagcga aattttgccc atggctcgtc cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040  
60 cgatcgtggc ggtgcccgca ggcattgaaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt 5100  
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160  
gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaataacctg aaaaatgttg 5220  
65 aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc ccagtccaa acctgggaga 5280  
aagcgtcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340

tccgctgac tggtcgacac ccatcccgag ctccgctgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400  
gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460  
5 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat 5520  
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580  
10 acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640  
agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700  
cagcttggat cggcgtgaat cactgagcg ggaaatgcc gctcatctgg ctcatctgac 5760  
15 cgggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820  
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggctttttc acataggctg agccgtggcc 5880  
20 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940  
gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac 6000  
gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060  
25 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120  
gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgatg 6180  
30 agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240  
taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300  
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360  
35 gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420  
agagccagcc g 6431  
40  
<210> 46  
<211> 6439  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum  
45  
<220>  
<223> SEQ\_ID\_46\_PCLIKSMCS\_PGRO\_1701\_1831\_META  
50  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11 )..(183 )  
<223> P1701/1831  
55  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (199 )..(1329 )  
<223> MetA without startcodon  
60  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1397 )..(1466 )  
<223> GroEL Terminator  
65  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1810 )..(2601 )  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2868 )..(3728 )  
<223> Ori-EC(pMB) complement  
5  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3874 )..(4548 )  
<223> Orf1  
10  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4882 )..(6003 )  
<223> REP Protein  
15  
<400> 46  
aaatctcgag cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga 60  
gtgctggcac tctcgggggt agagtgccaa ataggttgtt tgacacacag ttgttcaccc 120  
20 gcgacgacg cgtgtgctgga aaccacaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg 180  
attgcggccg cgcataatgcc caccctcgcg ccttcaggtc aacttgaaat ccaagcgatc 240  
25 ggtgatgtct ccaccgaagc cggagcaatc attacaaacg ctgaaatcgc ctatcaccgc 300  
tggggtgaat accgcgtaga taaagaagga cgcagcaatg tcgttctcat cgaacacgcc 360  
ctcactggag attccaacgc agccgattgg tgggtgact tgctcgggcc cggcaaagcc 420  
30 atcaacactg atatttactg cgtgatctgt accaacgtca tcgggtggtg caacggttcc 480  
accggacctg gctccatgca tccagatgga aatttctggg gtaatcgctt ccccgccacg 540  
35 tccattcgatg atcaggtaaa cgccgaaaaa caattcctcg acgcactcgg catcaccacg 600  
gtcgccgcag tacttggtgg ttccatgggt ggtgcccga ccctagagtg ggccgcaatg 660  
taccagaaa ctggtggcgc agctgctgtt cttgcagttt ctgcacgcgc cagcgcttgg 720  
40 caaatcgga ttcaatccgc ccaaattaag gcgattgaaa acgaccacca ctggcacgaa 780  
ggcaactact acgaatccgg ctgcaaccca gccaccggac tcggcgccgc ccgacgcac 840  
45 gccacactca cctaccgtgg cgaactagaa atcgacgaac gcttcggcac caaagcccaa 900  
aagaacgaaa acccactcgg tccctaccgc aagcccgacc agcgcttcgc cgtggaatcc 960  
tacttgact accaagcaga caagctagta cagcgtttcg acgcggctc ctacgtcttg 1020  
50 ctcaccgacg ccctcaaccg ccacgacatt ggtcgcgacc gcggaggcct caacaaggca 1080  
ctcgaatcca tcaaagttcc agtccttgtc gcaggcgtag ataccgatat tttgtacccc 1140  
55 taccaccagc aagaacacct ctccagaaac ctgggaaatc tactggcaat ggcaaaaatc 1200  
gtatcccctg tcggccacga tgctttcctc accgaaagcc gccaaatgga tcgcatcgtg 1260  
aggaacttct tcagcctcat ctcccagac gaagacaacc cttcgaccta catcgagttc 1320  
60 tacatctaaa ctagtccgga cctagggata tcgtcgacat cgatgctctt ctgcgttaat 1380  
taacaattgg gatcctctag agttctgtga aaaacaccgt ggggcagttt ctgcttcgag 1440  
65 gtgtttttta tttgtggggc actagaccgc ggattttaat cgctagcggg ctgctaaagg 1500  
aagcggaaac cgtagaaagc cagtccgcag aaacgggtgct gaccccgat gaatgtcagc 1560

tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt 1620  
gggcttacat ggcgatagct agactggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg 1680  
5 ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc 1740  
ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga 1800  
10 tegtctcgca tgattgaaca agatggattg cagcgagggt ctccggccgc ttgggtggag 1860  
aggctattcg gctatgactg ggcaacaacg acaatcggt gctctgatgc cgccgtgttc 1920  
cggctgtcag cgcaggggag cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg 1980  
15 aatgaactgc aggacgaggc agcgcggtta tcgtggctgg ccacgacggg cgcttccttg 2040  
gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg 2100  
20 ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct 2160  
gatgcaatgc ggcggtgca tacgcttgat ccggtacct gccattcga ccaccaagcg 2220  
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagcgg gtcttgctga tcaggatgat 2280  
25 ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcg 2340  
atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg 2400  
gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 2460  
30 tatcaggaca tagcgttggc taccgctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct 2520  
gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat 2580  
35 cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt cgaatgacc gaccaagcga 2640  
cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct 2700  
tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg 2760  
40 agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgccgg ccggcccggt gtgaaatacc gcacagatgc 2820  
gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttct cgtcactga ctcgctgcgc 2880  
45 tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc 2940  
acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg 3000  
50 aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat 3060  
cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg cgaaacccga caggactata aagataccag 3120  
gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga 3180  
55 tacctgtccg ctttctccc ttccggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg 3240  
tatctcagtt cgggtgtagt cgctcgtcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt 3300  
60 cagcccgacc gctgcgctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacct ggtaagacac 3360  
gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc 3420  
ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggct aactacggct aactagaag gacagtattt 3480  
65 ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc 3540  
ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc 3600

agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtg 3660  
aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag 3720  
5 atccttttaa aggccggcgc cggccgcgca aagtcccgtc tcgtgaaaat tttcgtgccg 3780  
cgtgattttc cgccaaaaac tttaacgaac gtctgttata atggtgtcat gaccttcacg 3840  
10 acgaagtact aaaattggcc cgaatcatca gctatggatc tctctgatgt cgcgctggag 3900  
tccgacgcgc tcgatgctgc cgtcgattta aaaacgggta tcggattttt ccgagctctc 3960  
gatacgacgg acgcgccagc atcacgagac tgggccagtg ccgcgagcga cctagaaact 4020  
15 ctctgtggcg atcttgagga gctggctgac gagctgcgtg ctcgccagc gccaggagga 4080  
cgcacagtag tggaggatgc aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgc 4140  
cctgacccgc gaggacggcg cgcaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc 4200  
20 cgcgagcgcg ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggctaggtc gcaaatggcg 4260  
ctggaagtgc gtcccccgag cgaaattttg gccatggtcg tcacagagct ggaagcggca 4320  
25 gcgagaatta tcgcgatcgt ggcggtgccc gcaggcatga caaacatcgt aaatgccgcg 4380  
tttcgtgtgc cgtggccgcc caggacgtgt cagcgccgcc accacctgca ccgaatcggc 4440  
agcagcgtcg cgcgtcgaaa aagcgcacag gcggcaagaa gcgataagct gcacgaatac 4500  
30 ctgaaaaatg ttgaacgcc cgtgagcggg aactcacagg gcgtcggcta acccccagtc 4560  
caaacctggg agaaagcgct caaaaatgac tctagcggat tcacgagaca ttgacacacc 4620  
35 ggcctggaat ttttcgcgtg atctgttcga caccatccc gagctcgcgc tgcgacacg 4680  
tggctggacg agcgaagacc gccgcgaatt cctcgtcac ctgggcagag aaaatttcca 4740  
gggcagcaag acccgcgact tcgccagcgc ttggatcaaa gaccggaca cggagaaaca 4800  
40 cagccgaagt tataccgagt tggttcaaaa tcgcttgccc ggtgccagta tgttgcctg 4860  
acgcacgcgc agcacgcagc cgtgcttgtc ctggacattg atgtgccgag ccaccaggcc 4920  
45 ggcgggaaaa tcgagcacgt aaaccccgag gtctacgcga ttttgagcgc ctgggcacgc 4980  
ctggaaaaag cgccagcttg gatcggcgtg aatccactga gcgggaaatg ccagctcatc 5040  
tggctcattg atccggtgta tgccgcagca ggcagtagca gccgaatat gcgcctgctg 5100  
50 gctgcaacga ccgaggaaat gaccgcggtt ttccgctg accaggcttt ttcacatagg 5160  
ctgagccgtg gccactgcac tctccgacga tcccagccgt accgctggca tgccagcac 5220  
55 aatcgctgg atcgctagc tgatcttatg gaggttgctc gcatgatctc aggcacagaa 5280  
aaacctaata aacgctatga gcaggagttt tctagcggac gggcacgtat cgaagcggca 5340  
agaaaagcca ctgcggaagc aaaagcactt gccacgctg aagcaagcct gccgagcgcc 5400  
60 gctgaagcgt ctggagagct gatcgacggc gtccgtgtcc tctggactgc tccaggcgt 5460  
gccgcccgtg atgagacggc ttttcgccac gctttgactg tgggatacca gttaaaagcg 5520  
65 gctggtgagc gcctaaaaga caccaagggg catcgagcct acgagcgtgc ctacaccgtc 5580  
gctcaggcgg tcggaggagg ccgtgagcct gatctgccgc cggactgtga ccgccagacg 5640

gattggccgc gacgtgtgcg cggctacgtc gctaaaggcc agccagtcgt ccctgctcgt 5700  
cagacagaga cgcagagcca gccgaggcga aaagctcttg ccactatggg aagacgtggc 5760  
5 ggtaaaaagg ccgcagaacg ctggaaagac ccaaacagtg agtacgcccg agcacagcga 5820  
gaaaaactag ctaagtccag tcaacgacaa gctaggaaaag ctaaaggaaa tcgcttgacc 5880  
10 attgcagggtt ggtttatgac tgttgaggga gagactggct cgtggccgac aatcaatgaa 5940  
gctatgtctg aatttagcgt gtcacgtcag accgtgaata gagcacttaa ggtctgcggg 6000  
cattgaactt ccacaggagc gccgaaagct tcccagtaaa tgtgccatct cgtaggcaga 6060  
15 aaacgggttcc cccgtagggt ctctctcttg gcctcctttc taggtcgggc tgattgctct 6120  
tgaagctctc tagggggggt cacaccatag gcagataacg ttccccaccg gctcgctctg 6180  
taagcgcaca aggactgctc ccaaagatct tcaaagccac tgccgcgact gccttcgca 6240  
20 agccttgccc cgcggaaatt tcctccaccg agttcgtgca cacccctatg ccaagcttct 6300  
ttcacccctaa attcgagaga ttggattctt accgtggaaa ttcttcgcaa aaatcgctcc 6360  
25 ctgatcgccc ttgcgacgtt ggcgtcgggt cgcgtggtg cgcttggtt gaccgacttg 6420  
atcagcggcc gctcgattt 6439

30 <210> 47  
<211> 6431  
<212> DNA :  
<213> Corynebacterium glutamicum  
35 <220>  
<223> SEQ\_ID\_47\_PCLIKSMCS\_PGRO\_1701\_1832\_META  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
40 <222> (726)..(899 )  
<223> P1701/1832  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
45 <222> (906)..(2036 )  
<223> MetA without startcodon  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
50 <222> (2104)..(2173 )  
<223> GroEL Terminator  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
55 <222> (2517)..(3308 )  
<223> KanR  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
60 <222> (3575)..(4435 )  
<223> Ori-EC(pMB) complement  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
65 <222> (4581)..(5255 )  
<223> Orf1  
  
<220>

<221> misc\_feature  
<222> (5589)..(279 )  
<223> REP Protein

5 <400> 47  
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggtg aaaaggccgc agaacgctgg 60  
aaagacccaa acagtgagta cgcccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120  
10 cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttgggt tatgactgtt 180  
gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240  
cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggta tgcgggcatt gaacttcac gaggacgccg 300  
15 aaagcttccc agtaaagtgt ccatctcgta ggcagaaaac ggttccccg tagggtctct 360  
ctcttggect cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420  
20 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcaacaagg ctgctcccaa 480  
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttcct 540  
ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600  
25 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660  
tcggtgccgc tggttgcgct tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaata 720  
30 tcgagcggct taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgtc 780  
ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgcac 840  
gacggtgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gagagattgc 900  
35 atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960  
ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgcta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020  
40 gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgcctc actggagatt 1080  
ccaacgcagc cgattgggtg gctgacttgc tcggtcccgg caaagccatc aacactgata 1140  
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200  
45 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggtg atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260  
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttcctcgacg cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320  
50 ttggtggttc catgggtggt gccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380  
ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcttgcaa atcggcattc 1440  
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500  
55 aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgccgccg acgcatcgcc cacctcacct 1560  
accgtggcga actagaaatc gacgaacgtc tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620  
60 cactcgggtc ctaccgcaag cccgaccagc gtttcgccgt ggaatcctac ttggactacc 1680  
aagcagacaa gctagtacag cgtttcgacg ccggctccta cgtcttgctc accgacgcc 1740  
tcaaccgcca cgacattggt cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800  
65 aagtccagc cttgtcgca ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860  
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920

gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980  
5 gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040  
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgcctcttctg cgtaatttaa caattgggat 2100  
cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttecgcggtg ttttttattt 2160  
10 gtggggcact agacccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaagggaag cggaacacgt 2220  
agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280  
ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340  
15 gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400  
cctctggtaa ggttggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460  
20 tctgatggcg caggggatca agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcata 2520  
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cgcccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580  
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640  
25 aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700  
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacggcgt tccttgcgca gctgtgctcg 2760  
30 acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820  
tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880  
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaag catcgcacg 2940  
35 agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000  
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgatg cccgacggcg 3060  
40 aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120  
gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180  
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240  
45 tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg 3300  
agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360  
50 atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420  
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 3480  
cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540  
55 accgcatcag gcgtctttcc gcttctctgc tctactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600  
tgccggcagc ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacgt gttatccaca gaatcagggg 3660  
60 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg 3720  
ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780  
gctcaagtca gagtgggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840  
65 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgcgct tactcgatac ctgtccgct 3900  
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg 3960



tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 4020  
5 ggcgcttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggg aagacacgac ttatcgccac 4080  
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt 4140  
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtattttgt atctgcgctc 4200  
10 tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260  
ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320  
15 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380  
gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg 4440  
ccggcccgcg ccgcgcaaag tcccgcctcg tgaaaatttt cgtgcccggt gatcttccgc 4500  
20 caaaaaacttt aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560  
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620  
25 atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg 4680  
cgccagcatc acgagacttg gccagtgcg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740  
ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800  
30 aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag 4860  
gacggcgcg c aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca 4920  
35 acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980  
ccccgagcga aattttggcc atggctcgta cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040  
cgatcgtggc ggtgcccgcg ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgctt cgtgtgccgt 5100  
40 ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160  
gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg 5220  
aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtcaa acctgggaga 5280  
45 aagcgtcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340  
tccgctgatc tgttcgacac ccaccccgag ctgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400  
50 gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcaagaaa atttcaggg cagcaagacc 5460  
cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat 5520  
55 accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cagcgcagc 5580  
acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640  
agcagtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700  
60 cagcttgat cggcgtgaat ccactgagcg ggaatgccg gctcatctgg ctcatctgac 5760  
cgggtgatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgct cctgctggct gcaacgaccg 5820  
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggccttttc acataggctg agccgtggcc 5880  
65 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940  
gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac 6000

gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060  
cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120  
5 gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcggtgcc gcccgatg 6180  
agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240  
10 taaaagacac caagggtcac cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300  
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360  
gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaagccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420  
15 agagccagcc g 6431

<210> 48  
20 <211> 6431  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
25 <223> SEQ\_ID\_48\_PCLIK5MCS\_PGRO\_1701\_1833\_META

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (726)..(899 )  
30 <223> P1701/1833

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (906)..(2036 )  
35 <223> MetA without startcodon

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2104)..(2173 )  
40 <223> GroEL Terminator

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2517)..(3308 )  
45 <223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3575)..(4435 )  
50 <223> Ori-EC(pMB) complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4581)..(5255 )  
55 <223> Orf1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5589)..(279 )  
60 <223> REP Protein

<400> 48  
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggtg aaaaggccgc agaacgctgg 60  
65 aaagacccaa acagtgagta cgcccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120  
cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttgggt tatgactgtt 180

gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240  
cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggctc tgcgggcatt gaacttcac gaggacgccg 300  
5 aaagcttccc agtaaatgtg ccatctcgtg ggcagaaaac ggttccccg tagggtctct 360  
ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420  
10 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480  
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttctt 540  
ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600  
15 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660  
tcgggtgccg tggttgcgct tggttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaatc 720  
tcgagcggct taaagtttg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgt 780  
20 ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgcac 840  
gacggctgtg ctggaaacc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg aggagattgc 900  
25 atatgcccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960  
ccgaagcccg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgcta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020  
gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgccctc actggagatt 1080  
30 ccaacgcagc cgattgggtg gctgacttgc tcggtcccgg caaagccatc aacactgata 1140  
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200  
35 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggtg atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260  
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttctcgacg cactcggcat caccacggct gccgcagtac 1320  
40 ttggtgggtc catgggtggg gcccgcacc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380  
ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcttgcaa atcggcattc 1440  
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500  
45 aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgcgcgcc acgcatcgcc cacctcacct 1560  
accgtggcga actagaaatc gacgaacgtc tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620  
50 cactcggctc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgcgt ggaatcctac ttggactacc 1680  
aagcagacaa gtagtacag cgtttcgacg ccggctccta cgtcttgctc accgacgcc 1740  
tcaaccgcca cgacattggg cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800  
55 aagttccagt cctgtcgcg ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860  
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920  
60 gccacgatgc tttctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980  
gcctcatctc ccgagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040  
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctttctg cgtaattaa caattgggat 2100  
65 cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcgggtg tttttatatt 2160  
gtggggcact agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt 2220

agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280  
ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340  
5 gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400  
cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460  
10 tctgatggcg caggggatca agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga 2520  
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580  
atgactgggc acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640  
15 aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700  
acgaggcagc ggggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg 2760  
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820  
20 tcctgtcatc tcacctgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880  
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg 2940  
25 agcagcacg tactcgatg gaagccggct ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000  
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 3060  
aggatctcgt cgtgaccat ggcgatgctt gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120  
30 gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180  
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240  
35 tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg 3300  
agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360  
atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420  
40 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca 3480  
cgctagcggc gcgcggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540  
45 accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600  
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg 3660  
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg 3720  
50 ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780  
gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840  
55 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct 3900  
ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg 3960  
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct 4020  
60 gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac 4080  
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt 4140  
65 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc 4200  
tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260

ccgctggtag cggtaggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320  
ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380  
5 gtttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg 4440  
ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgcctcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc 4500  
10 caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560  
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620  
atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg 4680  
15 cgccagcatc acgagactgg gccagtgcg ccgagcgacct agaaactctc gtggcggtac 4740  
ttgaggagct ggctgacgag ctgctgtctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800  
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tcccggcct gacccgcgag 4860  
20 gacggcgcgcc aaaaatttgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca 4920  
acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980  
25 ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040  
cgatcgtggc ggtgcccgcg ggcattgaca acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt 5100  
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160  
30 gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg 5220  
aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc ccagtccta acctgggaga 5280  
35 aagcgtcaa aatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340  
tccgctgacg tgttcgacac ccatcccagc ctgcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400  
gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460  
40 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat 5520  
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccgtt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580  
45 acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640  
agcacgtaaa ccccagggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700  
cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgac 5760  
50 cgggtgatgc cgacgaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820  
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggccttttc acataggctg agccgtggcc 5880  
55 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940  
gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa ctaaaaaaac 6000  
gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060  
60 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120  
gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcggtgc gcccgatg 6180  
65 agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggtt ggtgagcgcc 6240  
taaaagacac caagggcatc cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgtc caggcggtcg 6300

```

gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
gtgtgcgccg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
5 agagccagcc g 6431

<210> 49
<211> 6431
10 <212> DNA
    <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_49_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1834_META
15
<220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899 )
<223> P1701/1834
20
<220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036 )
<223> MetA without startcodon
25
<220>
<221> misc_feature
<222> (2104)..(2173 )
<223> GroEL Terminator
30
<220>
<221> misc_feature
<222> (2517)..(3308 )
<223> KanR
35
<220>
<221> misc_feature
<222> (3575)..(4435 )
<223> Ori-EC(pMB) complement
40
<220>
<221> misc_feature
<222> (4581)..(5255 )
<223> Orf1
45
<220>
<221> misc_feature
<222> (5589)..(279 )
<223> REP Protein
50
<400> 49
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggta aaaaggccgc agaacgctgg 60
aaagacccaa acagtgagta cggccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttgggt tatgactgtt 180
gaggggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
60 cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggtc tgcgggcatt gaacttcac gaggacgccg 300
aaagcttccc agtaaatgtg ccatctcgta ggcagaaaac gggtccccc taggggtctct 360
ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
65 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttcct 540

```

ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600  
5 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660  
tcggtgccgc tggttgcgct tggtttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaattc 720  
tcgagcggct taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgtc 780  
10 ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagtgtgt caccgcgcac 840  
gacggctgtg ctggaacccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg aagggttgc 900  
15 atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960  
ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgtg aaatcgcta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020  
gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgcctc actggagatt 1080  
20 ccaacgcagc cgattgggtg gctgacttgc tcggtcccgg caaagccatc aacactgata 1140  
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200  
25 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260  
aggtaaaccg cgaaaaacaa ttctcgacg cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320  
ttggtggttc catgggtggt gccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380  
30 ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcttgcaa atcggcattc 1440  
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500  
aatccggtg caaccagcc accggactcg gcgcgcgccg acgcatcgcc cacctcacct 1560  
35 accgtggcga actagaaatc gacgaacgtc tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620  
cactcggctc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgcctg ggaatcctac ttggactacc 1680  
40 aagcagacaa gctagtacag cgtttcgacg ccggctccta cgtcttgctc accgacgcc 1740  
tcaaccgcca cgacattggt cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800  
45 aagttccagt ccttgtcgca ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860  
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tccctgtcg 1920  
gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgcc aatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980  
50 gcctcatctc ccagacgaa gacaacctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040  
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat 2100  
55 cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcgggtg ttttttattt 2160  
gtggggcact agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt 2220  
agaaagccag tccgcagaaa cgggtgtgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280  
60 ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340  
gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400  
cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460  
65 tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata 2520  
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580

atgactgggc acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640  
5 agggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700  
acgaggcagc ggggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg 2760  
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc 2820  
10 tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880  
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcacgc 2940  
15 agcagcacg tactcgatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000  
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcacg cccgacggcg 3060  
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgctt gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120  
20 gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180  
cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240  
25 tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg 3300  
agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360  
atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420  
30 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca 3480  
cgctagcggc gcgcgggccc gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540  
35 accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600  
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggaatacgc gttatccaca gaatcagggg 3660  
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720  
40 ccgcgttgct ggcgtttttc cataggtccc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780  
gtcaagtca gaggtggcga aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840  
45 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct 3900  
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggatc ctcagttcgg 3960  
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct 4020  
50 gcgccttatc cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac 4080  
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt 4140  
55 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc 4200  
tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260  
ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat 4320  
60 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380  
gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg 4440  
65 ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgccttc tgaaaatctt cgtgccgcgt gattttccgc 4500  
caaaaacttt aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560  
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620



atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg 4680  
5 cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740  
ttgaggagct ggctgacgag ctgctgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800  
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag 4860  
10 gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca 4920  
acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980  
ccccgagcga aattttggcc atggctcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040  
15 cgatcgtggc ggtgcccga ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt 5100  
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160  
20 gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg 5220  
aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga 5280  
aagcgtcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340  
25 tccgctgac tggtcgacac ccacccgag ctgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400  
gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460  
30 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtatt 5520  
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cagcgcgacg 5580  
acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640  
35 agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700  
cagcttgat cggcgtgaat cactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgac 5760  
40 cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820  
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggcgttttc acataggctg agccgtggcc 5880  
actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgctggatc 5940  
45 gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa ctaaaaaaac 6000  
gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060  
50 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120  
gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcggtgcc gcccgtagt 6180  
agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240  
55 taaaagacac caagggcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300  
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360  
60 gtgtgcgagg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420  
agagccagcc g 6431

65 <210> 50  
<211> 1005  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_50\_FRUCTOSE\_1\_6\_BISPHOSPHATASE

5 <400> 50  
 atgaacctaa agaaccgccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgcgagtt 60  
 acggaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttggac gtggcatgaa gaatgaaggc 120  
 10 gacggtgccc ctggtgacgc catgcgccag ctcacaaact cagtgaccat gaagggcgctc 180  
 gttgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggctc 240  
 15 ggaaccggct ttggacctga ggttgatata gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300  
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgag ctgcagagcg tggcaccatg 360  
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatcgccg tgggacctga ggccgcaggc 420  
 20 aagatcgaca tcgaagctcc agttgccac aacatcaacg cgggtggcaa gtccaaggga 480  
 atcaaccctt ccgacgtcac cgttgctcgtg cttgaccgtc ctgcacacat cgaactgac 540  
 25 gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggt cgtctcatct ccgacggcga cgttgacagt 600  
 gcagttgcag cagctcagga ttccaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaacc 660  
 ccagaaggca tcatcactgc gtgcgccatg aagtgcattg gtggcgaaat ccagggcatc 720  
 30 ctggccccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctggtct ggttcttgat 780  
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccggt 840  
 gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggt tcctaccgag caaacggcgc aaccaccctg 900  
 35 tccctgggta tgccgcgcaa gtcaggcacc atccgccaca tcgagtctgt ccaccagctg 960  
 tccaagctgc aggaatactc cgtgggtgac tacaccaccg cgacc 1005

40

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

45

&lt;400&gt; 51

Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu  
 1 5 10 15  
 50 Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val  
 20 25 30  
 55 Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met  
 35 40 45  
 Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly  
 50 55 60  
 60 Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val  
 65 70 75 80  
 Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp  
 85 90 95  
 65 Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu  
 100 105 110

## 56

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr  
                   115                                  120                                  125  
 5 Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile  
                   130                                  135                                  140  
 Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly  
   145                                  150                                  155                                  160  
 10 Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His  
                                   165                                  170                                  175  
 Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu  
                                   180                                  185                                  190  
 15 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser  
                                   195                                  200                                  205  
 20 Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile  
                   210                                  215                                  220  
 Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile  
   225                                  230                                  235                                  240  
 25 Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly  
                                   245                                  250                                  255  
 Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp  
                                   260                                  265                                  270  
 30 Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg  
                                   275                                  280                                  285  
 Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met  
   290                                  295                                  300  
 35 Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu  
   305                                  310                                  315                                  320  
 40 Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr  
                                   325                                  330                                  335  
  
 45 <210> 52  
     <211> 6  
     <212> DNA  
     <213> Corynebacterium glutamicum  
  
 50 <220> .  
     <223> SEQ\_ID\_52\_POTENTIELLE\_10\_REGION\_1  
  
     <400> 52  
     tagagt  
  
 55  
     <210> 53  
     <211> 7  
     <212> DNA  
     <213> Corynebacterium glutamicum  
 60  
     <220>  
     <223> SEQ\_ID\_53\_RIBOSOMALE\_BINDUNGSSTELLE\SHINE\_DALGARNO  
  
     <400> 53  
 65 ggagggga

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/77 C07K14/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE LEÓN P ET AL: "Streptomyces lividans groES, groEL1 and groEL2 genes." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) NOV 1997, vol. 143 ( Pt 11), November 1997 (1997-11), pages 3563-3571, XP002323102 ISSN: 1350-0872 the whole document ----- -/--	1-54

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2005

Date of mailing of the international search report

27/04/2005

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Novak-Giese, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TAUSCHEK M ET AL: "Transcriptional analysis of the groESL operon of Neisseria gonorrhoeae"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 189, no. 1, 11 April 1997 (1997-04-11), pages 107-112, XP004059567</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>THIES F L ET AL: "Cloning, sequencing and molecular analysis of the Campylobacter jejuni groESL bicistronic operon."</p> <p>MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) JAN 1999, vol. 145 ( Pt 1), January 1999 (1999-01), pages 89-98, XP002323246</p> <p>ISSN: 1350-0872</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>GUPTA R S: "EVOLUTION OF THE CHAPERONIN FAMILIES (HSP60, HSP10 AND TCP-1) OF PROTEINS AND THE ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 15, no. 1, 1995, pages 1-11, XP000611319</p> <p>ISSN: 0950-382X</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>KALINOWSKI J ET AL: "THE COMPLETE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ATCC 13032 GENOME SEQUENCE AND ITS IMPACT ON THE PRODUCTION OF L-ASPARTATE-DERIVED AMINO ACIDS AND VITAMINS"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 104, no. 1-3, 4 September 2003 (2003-09-04), pages 5-25, XP001184752</p> <p>ISSN: 0168-1656</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Function of Corynebacterium glutamicum promoters in Escherichia coli, Streptomyces lividans, and Bacillus subtilis."</p> <p>4 September 2003 (2003-09-04), JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, VOL. 104, NR. 1-3, PAGE(S) 325 - 334 , XP002323103</p> <p>ISSN: 0168-1656</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Promoters of Corynebacterium glutamicum." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, vol. 104, no. 1-3, 4 September 2003 (2003-09-04), pages 311-323, XP002323247 ISSN: 0168-1656 the whole document	1-54
A	WO 02/40679 A2 (RAYAPATI P J) 23 May 2002 (2002-05-23) the whole document	1-54

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/014263

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0240679	A2	23-05-2002	AU	3043102 A	27-05-2002
			US	2003017553 A1	23-01-2003
-----					

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014263

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12N15/77 C07K14/34

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE LEÓN P ET AL: "Streptomyces lividans groES, groEL1 and groEL2 genes." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) NOV 1997, Bd. 143 ( Pt 11), November 1997 (1997-11), Seiten 3563-3571, XP002323102 ISSN: 1350-0872 das ganze Dokument ----- -/--	1-54

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. April 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/04/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Novak-Giese, S



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>TAUSCHEK M ET AL: "Transcriptional analysis of the groESL operon of Neisseria gonorrhoeae"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB,</p> <p>Bd. 189, Nr. 1,</p> <p>11. April 1997 (1997-04-11), Seiten 107-112, XP004059567</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>THIES F L ET AL: "Cloning, sequencing and molecular analysis of the Campylobacter jejuni groESL bicistronic operon."</p> <p>MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) JAN 1999, Bd. 145 ( Pt 1), Januar 1999 (1999-01), Seiten 89-98, XP002323246</p> <p>ISSN: 1350-0872</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>GUPTA R S: "EVOLUTION OF THE CHAPERONIN FAMILIES (HSP60, HSP10 AND TCP-1) OF PROTEINS AND THE ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB,</p> <p>Bd. 15, Nr. 1, 1995, Seiten 1-11, XP000611319</p> <p>ISSN: 0950-382X</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>KALINOWSKI J ET AL: "THE COMPLETE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ATCC 13032 GENOME SEQUENCE AND ITS IMPACT ON THE PRODUCTION OF L-ASPARTATE-DERIVED AMINO ACIDS AND VITAMINS"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL,</p> <p>Bd. 104, Nr. 1-3,</p> <p>4. September 2003 (2003-09-04), Seiten 5-25, XP001184752</p> <p>ISSN: 0168-1656</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Function of Corynebacterium glutamicum promoters in Escherichia coli, Streptomyces lividans, and Bacillus subtilis."</p> <p>4. September 2003 (2003-09-04), JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, VOL: 104, NR. 1-3, PAGE(S) 325 - 334 , XP002323103</p> <p>ISSN: 0168-1656</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-54

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014263

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Promoters of Corynebacterium glutamicum." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, Bd. 104, Nr. 1-3, 4. September 2003 (2003-09-04), Seiten 311-323, XP002323247 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
A	<p>WO 02/40679 A2 (RAYAPATI P J) 23. Mai 2002 (2002-05-23) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

T/EP2004/014263

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0240679 A2	23-05-2002	AU 3043102 A US 2003017553 A1	27-05-2002 23-01-2003
<hr/>			